

Screening und Charakterisierung von Peptidliganden für den BCR-ABL mRNA Translokationsbereich

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich chemische und pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Jörg Bäuml
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2004
(DF1)

Vom Fachbereich
chemische und pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen

Dekan Prof. Dr. Schwalbe _____

1. Gutachter Prof. Dr. Engels _____

2. Gutachter Prof. Dr. Wels _____

Datum der Disputation _____

思而
学而不
子思
则罔
殆

Lernen, ohne zu denken, ist eitel,
denken, ohne zu lernen, ist gefährlich.

Konfuzius

Meinen Eltern

1 EINLEITUNG	9
1.1 DAS RNA MOLEKÜL	9
1.1.1 NCRNAS ALS WICHTIGE REGULATORISCHE ELEMENTE DER ZELLE UND NEUE MÖGLICHKEITEN DER INTERAKTION MIT LIGANDEN	12
1.1.2 NCRNAS ALS RNA-LIGANDEN	13
1.1.3 MI- UND SIRNA ALS BEISPIELE FÜR NCRNAS	14
1.1.4 BIOGENESE VON MI- UND SIRNAS	15
1.1.5 DIFFERENZIERUNG VON ADULTEN NEURONALEN STAMMZELLEN DURCH NCRNA	17
1.2 SYNTHETISCHE NUKLEINSÄUREN ALS RNA-LIGANDEN	17
1.2.1 VERGLEICH DER VERSCHIEDENEN RNA-LIGANDEN	21
1.3 NIEDERMOLEKULARE SUBSTANZEN ALS RNA LIGANDEN	21
1.3.1 AMINOGLYKOSID DERIVATE ALS LIGANDEN GEGEN DIE RNA RRE STRUKTUR	22
1.3.2 PEPTIDLIGANDEN FÜR DIE PSI-RNA STRUKTUR VON HIV	23
1.3.3 PEPTID-CHINOLIN-KONJUGATE ALS RNA LIGANDEN	23
1.3.4 DAS THERAPEUTISCHE POTENTIAL VON PEPTIDEN	24
1.3.5 VORTEILE VON RNA-LIGANDEN	24
1.4 DIE BCR-ABL POSITIVE LEUKÄMIE	25
1.4.1 DIE PHILADELPHIA TRANSLOKATION	25
1.4.2 BCR-ABL UND LEUKÄMIE	27
1.4.3 AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE	27
1.4.4 CHRONISCHE MYELOISCHE LEUKÄMIE	28
1.5 MOLEKULARE ANSÄTZE EINER THERAPIE BEI PH+ LEUKÄMIEN: STI 571	29
1.5.1 AMINOGLYKOSIDE ALS BCR-ABL mRNA BINDER	30
1.6 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	32
2 MATERIAL UND METHODEN	33
2.1 GERÄTE	33
2.2 CHEMIKALIEN UND BIOCHEMIKALIEN	35
2.3 KITS	38
2.4 ENZYME	38
2.5 BAKTERIENSTÄMME	39
2.6 PHAGENSTÄMME	39
2.7 OLIGONUKLEOTIDE	40
2.8 PEPTIDE	43
2.9 VEKTOREN UND KOLONIERUNGSSTRATEGIE: DER PRL-TK VEKTOR UND DER LUZIFERASE T7-KONTROLL DNA VEKTOR (PROMEGA)	43
2.10 GRÖßENSTANDARDS	46
2.11 MEDIEN/LÖSUNGEN	46
2.12 ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN	47
2.12.1 HYBRIDISIEREN VON DNA-OLIGONUKLEOTIDEN	47
2.12.2 IN-VITRO-TRANSKRIPTION	47
2.12.3 DNASE VERDAU	48
2.12.4 PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION VON DNA UND RNA	48
2.12.5 GMPS-REAKTION ZUR KOVALENTEN MARKIERUNG VON RNA	49
2.12.6 GELELUTION VON TRANSKRIBIERTER RNA AUS DENATURIERENDEN POLY-ACRYLAMID- GELEN / UV-SHADOWING	50
2.12.7 GELRETARDATIONSEXPERIMENTE MIT BIOTINYLIERTER RNA	51

2.12.8 GEKOPPELTE IN-VITRO-TRANSLATION UND -TRANSKRIPTION: DAS TNT QUICK COUPLED TRANSCRIPTION/TRANSLATION SYSTEM	51
2.12.9 SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE DER B2A2 mRNA DURCH MFOLD	52
2.12.10 STRUKTURMAPPING DER RNA	53
2.12.11 RNASE INKUBATION UND REVERSE-TRANSKRIPTASE REAKTION	53
2.12.12 HYDROLYTISCHE SPALTUNG DER RC10 RNA MIT EINER KÜNSTLICHEN NUKLEASE	56
2.12.13 RESTRIKTIONSVERDAU VON PLASMID-DNA	56
2.12.14 KINASIEREN UND DEPHOSPHORYLIEREN VON NUKLEINSÄUREN	57
2.12.15 LIGATION VON VEKTOREN MIT INSERTS UND TRANSFORMATION	57
2.12.16 PLASMID MINIPRÄPARATION DURCH ALKALISCHE LYSE	58
2.12.17 PLASMID MAXIPRÄPARATION MIT JETSTER GENOMED SÄULEN	59
2.13 ARBEITEN MIT PROTEINEN	59
2.13.1 TNT QUICK COUPLED TRANSKRIPTION/TRANSLATION SYSTEM: DER EINFLUSS DER PEPTIDE AUF DIE EXPRESSION	59
2.13.2 RABBIT RETICULOCYTE LYSATE SYSTEM, NUCLEASE TREATED: DER EINFLUSS DER PEPTIDE AUF DIE TRANSLATION	60
2.13.3 DUAL LUZIFERASE ASSAY ZUM AKTIVITÄTSNACHWEIS DER LUZIFERASEN	61
2.14 ARBEITEN MIT PHAGEN	63
2.14.1 DER M13 PHAGE	63
2.14.2 PHAGE DISPLAY ZUM FINDEN VON PEPTIDLIGANDEN	64
2.14.3 PHAGEN AMPLIFIKATION	66
2.14.4 FÄLLEN VON PHAGEN	67
2.14.5 BESTIMMUNG DER PHAGEN MOI: TITRIERUNG DER PHAGEN	68
2.14.6 CHARAKTERISIERUNG DER BINDENDEN PHAGEN	68
2.14.7 PHAGEN-KOLONIEN AMPLIFIKATION	68
2.14.8 PHAGEN LYSIS	69
2.14.9 SEQUENZIERUNG DER PHAGEN-DNA UND DEREN AUSWERTUNG	69
2.15 BIOPHYSIKALISCHE METHODEN	70
2.15.1 GELELEKTROPHORESE	70
2.15.2 AGAROSEGELE	70
2.15.3 POLYACRYLAMID-GELE	71
2.15.4 BESTIMMEN DER DNA/RNA KONZENTRATION	72
2.15.5 FLUORESCENZ KORRELATIONS- SPEKTROSKOPIE (FCS)	72
2.15.6 ERMITTELN DER PHAGEN-RNA INTERAKTION	74
2.15.7 ALLGEMEINE KONFIGURATION DES CONFOCORII	74
2.15.8 FCS-KOMPETITIONSEXPERIMENTE MIT KOMPETITOR RNA ODER SYNTHETISIERTEM PEPTID	75
2.15.9 CIRKULARDICHROITISCHE TITRATIONSEXPERIMENTE	75
2.15.10 NACHWEIS DER PEPTID-RNA INTERAKTION	76
2.15.11 ALLGEMEINE CD-SPEKTROMETER EINSTELLUNGEN	76
2.15.12 ERMITTELN DES INTERAKTIONSORTES DER PEPTIDE MIT DER RNA	77
3 ERGEBNISSE	78
3.1 SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE DER ZIEL-RNA DURCH MFOLD	78
3.1.1 ANALYSE DER BCR-ABL RNA	81
3.1.2 STRUKTUR MAPPING DER B2A2 RNA	83
3.2 KOVALENTE MARKIERUNG DER RNA-TRANSKRIPTS AM 5'-ENDE	87
3.2.1 NICHTKOVALENTE MARKIERUNG DER RNA-TRANSKRIPTS	88
3.2.2 INTEGRITÄTSPRÜFUNG DER 10 ZIEL-RNAs	92
3.3 PHAGE DISPLAY ZUM FINDEN VON PEPTIDLIGANDEN FÜR DIE RNA	93
3.4 FLUORESCENZ KORRELATIONS- SPEKTROSKOPIE ZUM NACHWEIS DER PHAGEN-RNA INTERAKTION	96

3.5 CIRCULAR DICHROITISCHE MESSUNGEN ZUR BESCHREIBUNG DER PEPTID-RNA INTERAKTION	105
3.5.1 CIRCULAR DICHROITISCHE MESSUNGEN AN B2A2-RNA MUTANTEN	109
3.6 DUAL LUZIFERASE ASSAY ZUR BESTIMMUNG DES EINFLUSSES DER PEPTIDE AUF DIE GENEXPRESSION EINES REPORTERGENES	114
4 DISKUSSION	120
5 ZUSAMMENFASSUNG	130
ANHANG	132
ANHANG I MFOLD FALTUNGEN DER B2A2-RNA MUTANTEN	132
ANHANG II CD-SPEKTREN DER RNA MUTANTEN UND DER TITRATION DER PEPTIDE 12 & 14	134
LITERATURVERZEICHNIS	138
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	158
VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGREßBEITRÄGE	163
DANKSAGUNG	164
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	165
LEBENS LAUF	166

1 Einleitung

1.1 Das RNA Molekül

Das RNA Molekül nimmt eine zentrale Rolle innerhalb der Zelle ein. Bis vor wenigen Jahren noch als passiver Informationsüberträger bekannt, wurden inzwischen Eigenschaften charakterisiert, welche die RNA in ein neues Licht stellen.

Die RNA besitzt durch ihr häufig einzelsträngiges Vorkommen die Möglichkeit, verschiedene Domänen auszubilden. Einige von diesen Domänen sind stark konserviert und übernehmen verschiedene Aufgaben. So tritt z. B. die rRNA mit dem Ribosom in Interaktion und ermöglicht die korrekte Funktionsweise des Ribosomes. Die tRNA als RNA-Adaptermolekül vermittelt die Translation von der Nukleinsäureebene in die Proteinebene. Strukturmerkmale bei viralen RNAs sind notwendig für die Verpackung der RNA (Psi-RNA-Struktur) oder auch für den Kern-Export der viralen RNA (RRE-RNA Struktur). Diese RNA-Strukturmerkmale können und werden als Interaktionspartner für RNA-Liganden verwendet.

Liganden können in einfachsten Fall Proteine, aber auch synthetische niedermolekulare Substanzen sein. Dadurch kann die native Funktionsweise der RNA-Domäne verändert werden (Siehe Abschnitt 1.3) und gewünschte therapeutische Effekte herbeigeführt werden. Neben diesen „passiven“ Domänen, findet man auch RNA-Strukturen, welche sich in Abhängigkeit von ihrer Umgebung verändern und somit, gleichsam als Schalter, zwischen verschiedenen Zuständen wechseln können. Prominentestes Beispiel hierfür sind die Riboswitches (Abb. 1-1). Diese RNA-Strukturen können die Genexpression verändern, indem ein RNA-Aptamer mit einem Metabolit interagiert, daraufhin die Konformation ändert und somit direkten Einfluß auf die eigene Expressions-Plattform besitzt. Bekannte Riboswitches interagieren mit unterschiedlichen Metaboliten wie Thiaminpyrophosphat (TPP), s-Adenosylmethionin (SAM), Guanin und Lysin. Die Regulation der Expression kann dabei unterschiedlich verlaufen.

Der guaninspezifische Riboswitch xpt-pbx in *B.subtilis* (Mandal et al 2003) bildet einen anti-anti-terminator Stamm aus, wenn Guanosin abwesend ist. Wird die Konzentration von Guanosin erhöht, so verändert sich die Konformation und es formiert sich ein anti-terminator und ein terminator Stamm aus, welcher die Expression verhindert. Bei dem adeninspezifischen Riboswitches des ydhI Genes von *B.subtilis* (Mandal et al 2004) verhält es sich genau umgekehrt: Ist Adenin vorhanden, so verhindert dieses die Ausbildung eines Terminators. Wird die Konzentration verringert, so bildet sich ein anti-Terminator und die Expression kommt zum Erliegen.

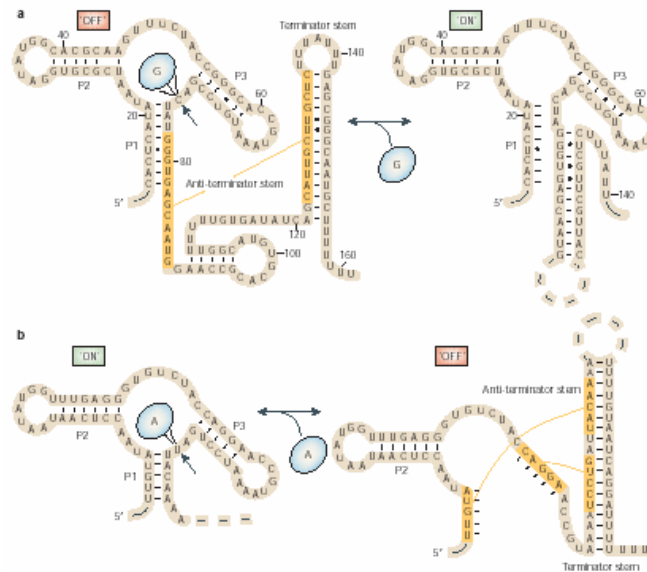


Abb. 1-1. Dargestellt sind zwei verschiedene Riboswitches mit konträren Effekten auf ihre Expressionsplattform. Der Guaninspezifische Riboswitch in *B. subtilis* bildet einen anti-anti-terminator Stamm aus, wenn Guanosin abwesend ist. Wird die Konzentration von Guanosin erhöht, so verändert sich die Konformation und es formiert sich ein anti-terminator und ein terminator Stamm aus, welcher die Expression verhindert (Obere Bilder). Der adeninspezifische Riboswitch von *B. subtilis* besitzt eine konträre Funktionsweise. Ist Adenin vorhanden, so verhindert dieses die Ausbildung eines Terminators, wird die Konzentration verringert, so bildet sich ein anti-terminator und die Expression kommt zum Erliegen. Diese beiden Beispiele zeigen, daß Riboswitches sowohl positive als auch negative Effekte auf die Translation von Genen besitzen. (Abb. aus: Mandal et al, 2004, Nature, doi:10.1038/nrm1403)

Ähnlich wie die Riboswitches funktionieren auch thermosensitive RNA-Elemente. Diese t-box-RNA Bereiche sind z. B. im 5'-UTR von Genen des *prfA* Genes bei *Listeria Monocytogenes* zu finden (Johansson et al 2002). Eine Temperaturveränderung von 30 °C zu 37 °C erhöht durch Konformationsänderung dieses RNA-Bereiches, die Expression um einen Faktor von 5.

RNA Moleküle können also mit Metaboliten ihrer Umgebung interagieren und auch durch temperaturabhängig Konformationsänderung die Genexpression verändern. Eine Kontrolle über die Genexpression liefern auch die sogenannten ncRNA. Diese nicht-kodierenden RNAs kodieren nicht für ein Protein, sondern sie können direkten Einfluß auf die Regulation der Genexpressionsmaschinerie nehmen.

Sie untergliedern sich in transkriptionelle RNA, wie rRNA und tRNA, sowie der neuen Gruppe der Small RNAs. In dieser Gruppe gibt es verschiedene Klassen von nicht-kodierenden RNAs, die jeweils ihre eigenen Funktionen und Eigenschaften besitzen (Abb. 1-2).

- MicroRNAs (miRNAs) sind 22-24 nt lang und regulieren die Expression dadurch, daß sie mit der entsprechende mRNA nicht perfekt hybridisieren und die Translation zu Proteinen verhindern.
- Small interfering RNAs (siRNAs). Diese RNAs besitzen eine Länge von etwa 22 nt und vermitteln das Phänomen des RNAi. mi- und siRNA wirken ähnlich und werden auch ähnlich prozessiert, jedoch binden siRNAs spezifisch die Target mRNA und markiert dieser somit für die Zerstörung.
- Small nucleolar RNAs (snoRNAs) sind RNAs, welche rRNAs modifizieren, indem sie die Prozessierung der langen pre-rRNA in die kleinen funktionalen Untereinheiten regulieren.

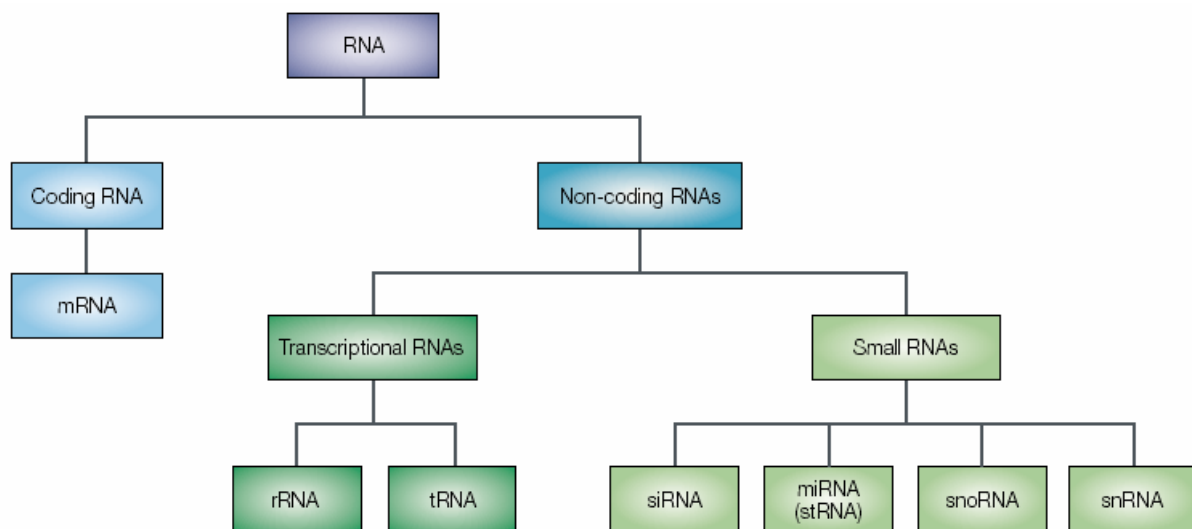


Abb. 1-2. Die Welt der RNA wird in kodierende und nicht kodierende RNAs unterteilt. Während die kodierende RNA in Form der mRNA für Proteine kodieren, übernehmen die nicht-kodierenden RNAs regulatorische Aufgaben (Small RNAs) oder unterstützen als „Transcriptional RNAs“ in Form von r- oder t-RNA die Expression. Die Small RNAs sind in ihrer aktiven Form häufig zwischen 20-30 nt lang und können als regulatorische Elemente direkten Einfluß auf die Expression besitzen. (Abb. aus: Buckingham et al, Nature Horizon Symposia, May 2003, The major world of microRNAs)

Im folgenden stellt sich natürlich die Frage, warum die ncRNAs als ein weiteres regulatorisches System in der Zelle notwendig sind.

1.1.1 ncRNAs als wichtige regulatorische Elemente der Zelle und neue Möglichkeiten der Interaktion mit Liganden

Wenn man das Genom nach Merkmalen durchsucht welche für die Expression von Proteinen notwendig sind, so werden die ncRNAs nicht detektiert. Es gibt Hinweise der vergleichenden Genomanalyse und molekularen Genetik, daß ncRNA, welche aus den Introns und Exons der proteinkodierenden Gene entstehen, einen großen Einfluß auf die Regulation des genetischen Flusses besitzen (Lee et al 2002, Lee et al 2003, Bartel et al 2004). Dadurch erhält man eine weitere regulatorische Ebene, auf welche durch synthetische Liganden der genetische Fluß gesteuert werden kann.

Durch die vergleichende Genomanalyse in Maus, Hund und Mensch beobachtet man signifikante konservierte Sequenzen, welche außerhalb der proteinkodierenden Sequenzen liegen (Aparicio et al 2002, Kirkness et al 2003). Mit Hilfe der molekularen Genetik beobachtet man darüber hinaus eine erhöhte Anzahl an ncRNAs, welche mit Krankheiten verknüpft sind. Dies sind u.a. B-Zell Lymphome, Lungenkarzinome, Prostatakarzinome und weitere (Mattick et al 2003, Sutherland et al 1996, Bussemakers et al 1999, Wolf et al 2001, Ridanpaa et al 2001, Vulliamy et al 2001, Ji et al 2003).

Als Beispiel hierfür ist die nicht-kodierende RNA MALAT-1 mit der Metastasierung von Lungenkrebs assoziiert. Das Transkript dieser ncRNA korreliert mit dem Metastasierungsgrad der Krankheit. Eine genaue Funktion diese ncRNA ist noch nicht bekannt. Inzwischen wird diese ncRNA als prognostischer Marker bei dieser Krankheit verwendet. Gefunden hat man dieses Transkript vom Chromosom 11q13 durch subtraktive Hybridisierung wobei unterschiedliche RNA Proben von nichtmetastasierenden und metastasierenden Zellen untereinander verglichen wurden (Ji et al 2003).

Allgemein benötigt man bei komplexen Organismen zwei verschiedene Systeme, welche miteinander interagieren können. Zum einen ein System, das strukturelle und funktionelle Komponenten enthält und zum zweiten benötigt man ein System, welche kontrollierende und organisierende Funktionen übernimmt. Beide Systeme müssen in dem Genom kodiert sein. Sowohl intuitive als auch mathematische Betrachtungen gehen davon aus, daß die Anzahl an regulativen Elementen eine nichtlineare Funktion der Anzahl der Gene in dem System sind (Croft et al 2003, Gagen et al 2004).

Wenn ein System also komplexer wird, so muß ein Großteil der Komplexitätszunahme für die Kontrolle verwendet werden. Diese nichtlineare Beziehung zwischen Regulation und Funktion ist Bestandteil von allen intern organisierten Systemen, wie der Genexpression. Aus diesem Grund besitzen alle diese Systeme eine Intrinsische-Komplexitätsgrenze, bei welcher eine kleine Zunahme der Funktionalität zu einer übermäßigen Zunahme bei der

Regulation führt. In Übereinstimmung mit dieser Vorhersage nimmt die Anzahl an Proteinregulatoren in Prokaryonten quadratisch mit der Genomgröße zu (Croft et al 2003). Durch Extrapolation aus diesen Daten erhält man den Punkt, welcher diese intrinsische Grenze repräsentiert. Diese Grenze liegt knapp oberhalb der bakteriellen Genomgröße (Croft et al 2003, Gagen et al 2004). Das System ist aus diesem Grund gesättigt, das heißt, jede kleine Zunahme auf der funktionellen Seite zieht eine große Zunahme auf der regulatorischen Seite nach sich (Mattick et al 1994). Hier hat man also den Hinweis, daß die Protein-basierte Regulation das Effizienzlimit bei Prokaryonten erreicht hat und eine weitere kombinatorische Kontrolle auf dieser Ebene diese Grenze nicht überschreiten kann. Eukaryonten müssen jedoch im Laufe der Evolution einen Weg gefunden haben, diese Grenze zu überschreiten.

1.1.2 ncRNAs als RNA-Liganden

Genomsequenzierungsprojekte ermitteln die Zahl der identifizierten proteinkodierenden Gene und über die Zahl wurde groß diskutiert. Die Erkenntnis, daß 98% des genomischen Outputs für ncRNA steht, wurde jedoch nicht weiter beachtet. Der Schlüssel, um ein RNA reguliertes System zu finden, liefern zunächst die Introns. Im Durchschnitt enthalten die proteinkodierenden Gene etwa 95-97% Introns (HUGO 2001, Venter et al 2001, Scherer et al 2003).

Für die etwa 1,5% proteinkodierenden Sequenzen muß etwa 30% des Genomes transkribiert werden. Man hat somit einen Überschuß an nicht protein-kodierender Information. Es besteht in diesem Zusammenhang die Möglichkeit, daß die Introns genetisch aktiv sind und so genetische Informationen in das regulatorische Netzwerk der RNA einfließen (Mattick et al 1994, 2001). Als Folge hätte man ein System, welches parallel Proteine und regulatorische RNA liefert. Diese RNA könnte dann weiter prozessiert werden und einen Einfluß auf die chromatin Architektur, auf die Transkription, auf alternatives Spleißen oder auf die RNA Stabilität (Mattick et al 2003) nehmen.

Die Entdeckung der miRNA, welche sowohl aus den Exons als auch aus den Introns von längeren Vorläufern entsteht (Lee et al 2002, 2003; Bartel et al 2004) und den Einfluß, welches die RNA Interferenz auf chromosomale Dynamik besitzt, ist in Übereinstimmung mit dieser Vorhersage. Solch ein System würde die genetische Regulation verbessern und die Möglichkeit liefern, komplexere Systeme zu bilden.

1.1.3 mi- und siRNA als Beispiele für ncRNAs

MicroRNAs sind eine Familie von 21-25 nt langen RNAs, welche die Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene negativ regulieren können (del Solar et al 2000, Mlynarczk et al 2000, Ambros et al 2003). Zunächst wurde eine Untergruppe dieser Familie als small temporal RNA (stRNA) bei der Entwicklung von *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Pasquinelli et al 2002). Der Mechanismus, wie miRNA die Zielgene reguliert ist noch unbekannt, jedoch scheinen einige miRNAs durch den RNAi-Weg prozessiert zu werden.

miRNA Vorläufer bilden unvollständige Stem-Loop Strukturen aus (Bartel et al 2004, Lai et al 2003). Die reife miRNA entsteht von einem Arm des Vorläufers und wird Schritt für Schritt durch zwei RNaseIII-Enzyme gewonnen (Lee et al 2002/2003). Bei tierischen Zellen ist beobachtet worden, daß ein Großteil der miRNA mit der 3'-UTR der Ziel-RNA eine unvollständige Bindung eingeht und auf diese Weise als translationaler Repressor in Erscheinung tritt (Bartel et al 2004).

RNAi ist ein evolutionär konservierter, sequenz-spezifischer Mechanismus, welcher Genstummenschaltung hervorruft. Dieser Mechanismus wird durch dsRNA induziert (Hannon et al 2002). In vielen Systemen – z. B. in Würmern, Pflanzen und Fliegen - ist der Stimulus für die Initiierung des Mechanismus dsRNA von etwa 500 nt Länge. Diese dsRNA wird in vivo in kleine dsRNAs von 21-25 nt Länge prozessiert und wird dann siRNAs genannt (Elbashir et al 2001). Ein Strang von dem RNA-Duplex wird selektiv in den RISC-Effektor-Komplex eingeführt. Der RISC-Komplex vermittelt die Hydrolyse des komplementären mRNA Target (Zamore et al 2000). Dieser konservierte Mechanismus, welcher durch exogene dsRNA initiiert wird, könnte ein Schutzmechanismus gegen parasitäre Nukleinsäuren sein (Hannon et al 2000).

Darüber hinaus kann die Expression der Targettranskripte auf dem transkriptionellem Level durch RNAi reguliert werden. So induziert siRNA sequenz-spezifische Promotormethylierung in Pflanzen (Aufsatz et al 2002, Mette et al 2000), verändert die Heterochromatinstruktur in Hefe (Grewal et al 2003, Volpe et al 2002) und beeinflusst die Transposonmaschinerie in Würmern (Ketting et al 1999, Tabara et al 1999).

1.1.4 Biogenese von mi- und siRNAs

Zwei Prozessierungsschritte führen zu der reifen miRNA bei tierischen Zellen. Zunächst werden naszierende miRNA Transkripte (pri-miRNA) in etwa 70 nt lange Vorläufer (pre-miRNA) prozessiert. Anschließend werden diese Vorläufer in 21-25 nt lange Transkripte geschnitten, den reifen miRNAs (Lee et al 2002). Bis jetzt ist noch nicht genau bekannt, auf welche Weise die Transkription der pri-miRNA reguliert ist. Es ist jedoch erwiesen, daß miRNAs in Introns von Protein und nicht-Protein kodierenden Genen zu finden sind und die Transkription hier durch den Hostpromotor reguliert ist (Lagos-Quintana et al 2003).

Darüber hinaus scheinen einige miRNAs in polycistronische Transkripte geklustert zu sein (Lagos-Quintana et al 2003). Die sequentielle Prozessierung der miRNA Vorläufer geschieht durch zwei RNaseIII Enzyme, die Drosha und Dicer genannt werden (Lee et al 2003, Hutvanger et al 2001) (Abb. 1-3). Beides sind dsRNA spezifische Endonukleasen, welche 2 Nukleotid lange Überhänge an den 3'-Enden der Schnittstelle produzieren. Drosha ist im Kern zu finden und scheint exklusiv für die miRNA Prozessierung zur Verfügung zu stehen. Anschließend werden die miRNAs durch Exportin 5 in das Zytoplasma transportiert (Grishok et al 2001). Im Zytoplasma schließlich werden die Vorläufer zu kleinen nicht vollständigen dsRNA Duplexen (miRNA und miRNA*) prozessiert (Hutvanger et al 2001, Grishok et al 2001, Ketting et al 2001). Die Spezifität erreicht die Maschinerie dann, indem der miRNA Strang selektiv von dem RISC-Komplex ausgewählt wird (Schwarz et al 2003, Khurova et al 2003). Der miRNA* Strang wird währenddessen schnell abgebaut.

Die Auswahl welcher Strang ausgewählt wird, hängt von der Stabilität des 5' Endes der beiden Arme ab. Der Dicer-Komplex prozessiert die pre-miRNA in miRNA:miRNA* Duplexe. miRNAs kommen gewöhnlich von dem Strang mit dem weniger stabilen 5'-Ende im Vergleich zu dem miRNA* Strang (Schwarz et al 2003, Khurova et al 2003). Insofern scheint die relative Instabilität des 5'-Endes dafür verantwortlich zu sein, daß dieser Strang von dem RISC-Komplex ausgewählt wird.

Die unterschiedlichen thermodynamischen Eigenschaften bestimmen hier den asymmetrischen RISC Zusammenbau. In seltenen Fällen, bei welchen die thermodynamischen Eigenschaften der 5'-Enden ähnlich sind, wird jeder Arm des pre-miRNA Vorläufers mit gleicher Frequenz eingebaut (Schwarz et al 2003).

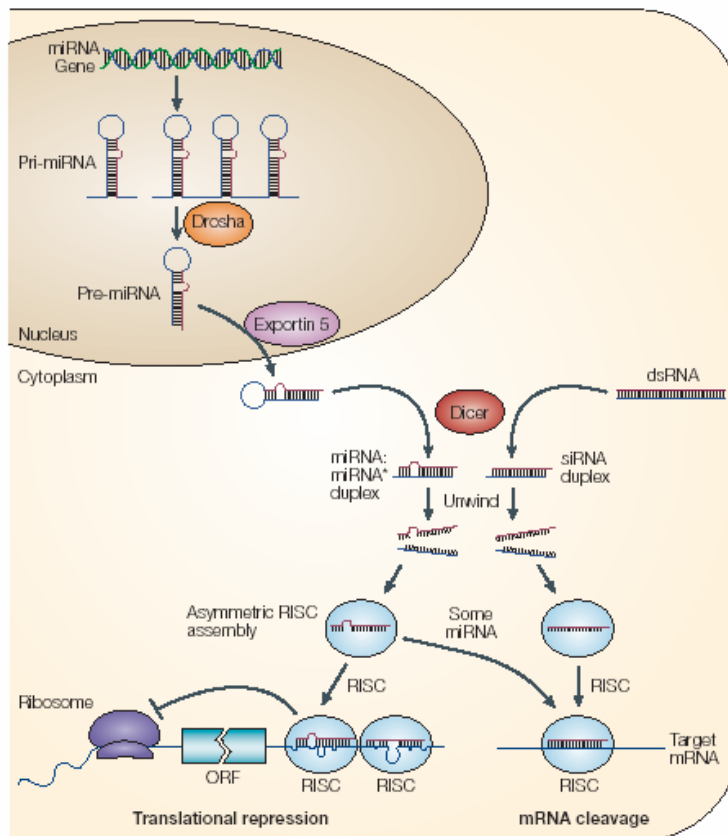


Abb. 1-3. Die Abbildung beschreibt schematisch die Biogenese von mi- und siRNA. Transkription von miRNA Genen, welche auch polycistronisch vorkommen können, liefern die pri-miRNA Vorläufer. Diese werden durch ein RNaseIII Enzym (Drosha) in 21-25 nt lange pre-miRNA Vorläufer prozessiert, welche durch Exportin 5 in das Zytoplasma transportiert werden.

Charakteristisch für die miRNA ist eine nicht perfekte Hybridisierung. Der miRNA Vorläufer wird im Zytosol von einem weiteren RNaseIII Enzym (Dicer) prozessiert und liefert miRNA: miRNA* Duplexe. Im RISC Komplex folgt ein asymmetrischer Zusammenbau, wobei derjenige miRNA-Strang ausgewählt wird, welcher die geringere thermodynamische Stabilität am 5'-Ende der miRNA:miRNA* besitzt. Hybridisieren diese RISC-miRNAs nicht perfekt mit der Ziel-RNA, so führt dies zu einer Repression der Translation.

Es besteht hier auch die Möglichkeit, daß unterschiedliche miRNAs an die Ziel-RNA binden und einen synergistischen Effekt auf die Translationsrepression ausüben. Ist die Hybridisierung der miRNA mit der Ziel-RNA perfekt, so kann dieses, ebenso wie bei der siRNA, zur Aktivierung des RNAi-Systems führen, bei welchem die Ziel-RNA spezifisch abgebaut wird. (Abb. aus: He et al, 2004, Nature Genetics, doi: 10.1038/nrg1379)

Ähnlich scheint die Auswahl bei siRNA zu funktionieren. siRNA wird im Vergleich zu den miRNAs nur von dem Dicer-Komplex in kleinere siRNAs prozessiert. Die entstehenden Duplexe sind vollkommen komplementär und bilden ein perfektes Duplex aus. Der RISC Komplex wählt dann nach den thermodynamischen Parametern den antisense Strang aus, der komplementär zu der mRNA ist, die abgebaut werden soll.

Auf diese Weise wird zum einen eine translationelle Repression erreicht oder eine Degradation der Ziel-mRNA. Bemerkenswerterweise finden diese Prozesse im Zytoplasma statt. Es wurden jedoch auch ncRNAs beschrieben, welche als transkriptioneller Aktivator hauptsächlich im Kern zu finden sind.

1.1.5 Differenzierung von adulten neuronalen Stammzellen durch ncRNA

Tomoko Kuwabara konnte als Erster zeigen, welchen Einfluß eine etwa 20 nt lange dsRNA auf die Differenzierung von neuronalen Stammzellen besitzt. Er konnte zeigen, daß diese ncRNA, welche im Kern lokalisiert ist, notwendig und ausreichend für die beginnende Differenzierung der Stammzelle hin zu Neuronen, ist. Die gefundene ncRNA ist dabei homolog zu dem sense und antisense Strang eines NRSE/RE1 (neuron restrictive silencer element) DNA-Promotorelementes, welches bei Genen vorhanden ist, die für neuronale Gene kodieren. Der genaue Mechanismus dieser Interaktion ist noch unklar.

ncRNAs können somit die Translation sowohl positiv als auch negativ regulieren. Die genauen Abläufe liegen jedoch noch im Verborgenen. Es wurde aber deutlich, welche zunehmend wichtige Rolle die ncRNAs bei der Expressionsregulation der Zelle besitzen.

1.2 Synthetische Nukleinsäuren als RNA-Liganden

Neben der Idee, die Genexpression durch ncRNAs zu regulieren kann man natürlich auch mRNA-Moleküle direkt als Ziel-Molekül nehmen und somit die Expression von Proteinen modulieren.

Moleküle, welche spezifisch bestimmte Gene herunterregulieren können, sind ein gutes Forschungsinstrument und finden auch auf dem therapeutischen Sektor ihre Anwendung.

Im Ganzen sind drei verschiedene Hauptgruppen bekannt: modifizierte Antisense-ODNs, Ribozyme sowie siRNA (Scherer et al 2003). Dazu kommt noch die Möglichkeit die mRNA mit niedermolekularen Substanzen anzugreifen.

Antisense-ODNs sind etwa 20 nt lange Sequenzen, die mit der pre-mRNA oder der mRNA hybridisiert werden können, und somit diese Stelle sensitiv für das Enzym RNase H markieren, die spezifisch RNA-DNA-Duplexe degradiert (Kurreck et al 2003).

Modifizierte ODNs, welche unempfindlich gegenüber RNase H sind können darüber hinaus verwendet werden:

- um die Translation der mRNA durch sterische Behinderung zu reprimieren (Baker et al 1997)
- um das Spleißen von pre-mRNA zu unterbinden (Lu et al 2003)
- um dsDNA als Zielmolekül zu nehmen (Uli et al 2003)

Um die Eigenschaften der Antisense-ODNs zu verändern, stehen verschiedene chemische Modifikationen zur Verfügung. So kann z.B. die Serumstabilität mit Beibehaltung der RNaseH Rekrutierung durch die Verwendung von Phosphorothioaten erhöht werden. Die Hybridisierungsstabilität kann durch alkylierte Ribosederivate erhöht werden (z. B. 2-O-(2-methoxyethyl), jedoch werden die entstehenden Duplexe nicht von der RNaseH erkannt. Durch diese Modifikationen, besonders durch die Verwendung von Phosphorothioaten, erhöhen sich auch die toxischen Effekte. Ab einer Konzentration von 200 nM kann die Proteinbiosynthese beeinflusst werden.

Die antisense-ODNs, welche im Gegensatz zu den siRNAs im Kern wirken, können durch verschiedene Methoden in die Zelle gebracht werden. Zum einen ermöglicht die Elektroporation den Zugang der ODNs in die Zelle und zum anderen können die ODNs auch mit Lipofectin in die Zelle transfiziert werden. Sind die ODNs in der Zelle, so wirken diese am besten in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen.

Ribozyme sind RNA Moleküle, die enzymatische Aktivität aufweisen. Sie binden RNA durch Watson-Crick Basenpaarung und degradieren die gebundene RNA durch Hydrolyse des Phosphodiester-Rückgrates (Doudna et al 2002), oder sie können kovalente Bindungen zwischen Nukleotiden knüpfen. So können durch mehrere Reaktionen in Trans defekte mRNA-Bereiche korrigiert werden, indem an dem korrigierten RNA-Bereich ein Ribozym gebunden ist (Jones et al 1997, Sullenger et al 1994, Lan et al 2000). Diese Transkatalyse wurde z. B. dazu verwendet Sichelzell β -Globin Transkripte zu korrigieren (Lan et al 1998). Allgemein benötigt die Reaktion einen neutralen pH-Wert und Magnesium. Der Ziel RNA-Bereich sollte eine gute Zugänglichkeit besitzen, da Ribozyme empfindlich auf Strukturen in diesem Gebiet reagieren.

Es gibt unterschiedliche Ribozyme, der Forschungsschwerpunkt liegt auf den Hammerheadribozymen. Diese Gruppe der Ribozyme bestehen aus nur 30 nt und sie werden häufig als trans-agierende Ribozyme verwendet. Die Sequenzen, die für die Erkennung der Ziel RNA verantwortlich sind, können verändert werden, so daß fast jede beliebige RNA-Sequenz als Ziel verwendet werden kann. Die einfache Spaltstelle der Ziel-RNA mit dem UH-Sequenzmotiv (wobei H sowohl U, C oder A sein kann), trägt mit zu dem einfachen Aufbau des Ribozymes bei (Abb. 1-4).

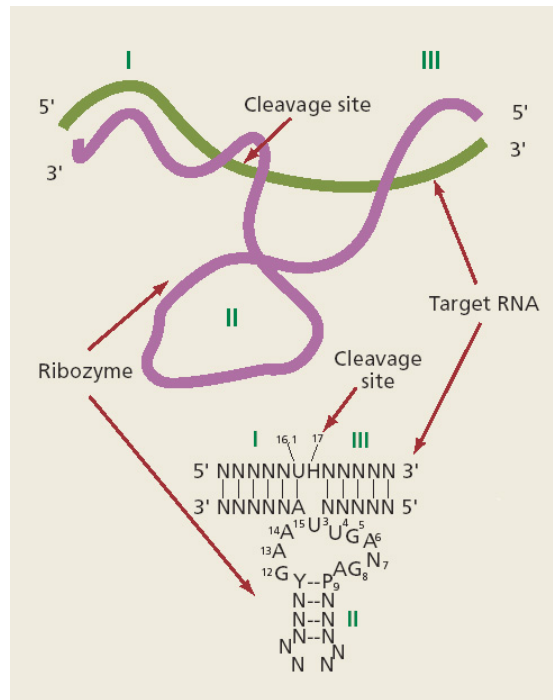


Abb. 1-4. Das Hammerheadribozym kann, durch die Schlichkeit der Spaltstelle (UH, H=U, C, A) und durch die Anpassung der 5'- und 3'- Bereiche an die Ziel-RNA mit einer Vielzahl von RNA-Molekülen spezifisch interagieren. Durch diese veränderte Sequenz kann das Ribozym mit der Ziel-RNA hybridisieren. (Abb. aus: Scherer et al, 2003, Nature Biotechnology, doi:10.1038/nbt915)

Antisense-ODNs und Ribozyme können, im Gegensatz zu den siRNAs, dazu verwendet werden, Vorläufer-RNA als Ziel zu nehmen. So ist es mit Ribozymen möglich RNA zu degradieren, noch bevor diese das Zytoplasma erreicht. Auf diese Weise wurde ein anti-HIV Ribozym konstruiert, das im Kern der infizierten Zelle die HIV Replikation verhindern konnte (Michienzi et al 2000).

siRNAs sind kleine dsRNA Fragmente, die durch den Dicer sowie RISC-Komplex prozessiert wurden und im Kontext des RNAi spezifisch die Ziel-RNA abbauen kann. Im Gegensatz zu Antisense-ODNs oder Ribozymen können pre-mRNAs nicht gut als Ziel verwendet werden, da das RNAi System im Zytoplasma lokalisiert ist (Zeng et al 2002).

Ein Vorteil ist, daß der RNAi-Mechanismus ein endogener Mechanismus ist. Dieser wird zur Regulation der Genexpression von Zellen verwendet (Carrington et al 2003, Bartel et al 2004). Auch wurden RNAi-abhängige Veränderungen an der Chromatinstruktur beschrieben, welche ebenfalls die Expression beeinflussen. (Wassenegger et al 1998, Mette et al 2000, Wang et al 2001, Volpe et al 2002).

Werden die dsRNA-Fragmente chemisch modifiziert, um die Serumstabilität zu erhöhen, so werden hier ebenso wie bei den Antisense-ODNs toxische Effekte beobachtet (Dorsett et al 2004). Aber auch hier ist die toxische Konzentration vom Zelltyp und von der Transfektionsmethode abhängig.

Damit siRNA als Therapeutikum genutzt werden kann, sind noch einige Hürden zu überwinden. Eines davon ist das Problem der zellulären Aufnahme. Ribozyme und Antisense-ODNs werden mit verschiedenen Methoden in die Zelle gebracht. Für siRNAs gibt es ebenfalls verschiedene Methoden. Elektroporation, lokale sowie systemische Injektion werden verwendet (Hommel et al 2003, Matsuda et al 2003). Die Vorteile des RNAi-Systems wurde bei Tierversuchen mit Mäusen beschrieben. Durch Hochdruck-Schwanzveneninjektion von siRNA konnte bei Mäusen eine 90%ige Reduktion der Zielgen-Expression in der Leber und in der Lunge beobachtet werden (Sorensen et al 2003, McCaffrey et al 2002). Durch die Entdeckung, daß bestimmte Moleküle die transdermale Penetration stark erhöhen, können Antisense-ODNs und siRNAs auf diesem Weg aufgenommen werden (Karande et al 2004). Es besteht natürlich auch die Möglichkeit, chemisch modifizierte siRNA zu verwenden – z. B. Phosphorthioat Modifikationen – um die Serumstabilität zu erhöhen. Dies könnte dann zu toxischen Problemen führen, wie bei den chemisch modifizierten Antisense-ODNs. Jedoch muß man beachten, daß die siRNA Konzentration um 2 bis 3 log-Stufen geringer sein kann als bei den Antisense-ODNs.

Um siRNAs in die Zelle zu bringen, bieten Retroviren und Lentiviren eine Lösungsmöglichkeit. Die Vektoren benötigen einen polIII Promotor, welcher die Transkription der siRNAs reguliert. Dabei kann man den sense sowie antisense Strang von getrennten Promotorkassetten exprimieren lassen, so daß die beiden ssRNAs in der Zelle hybridisieren oder man transkribiert eine so genannte shRNA. Bei dieser shRNA wird nur ein RNA-Strang transkribiert, wobei zwischen den komplementären sense und antisense Strang ein kurzer interner Loop liegt. Diese shRNA nimmt dann eine Stamm-Loop Konformation ein, wobei der Loop von dem RISC-Komplex entfernt wird und der Stamm die aktive siRNA Komponente enthält. Durch positiv geladene Moleküle wie Protamin können ex vivo generierte siRNAs in die Zelle transfiziert werden. Möglich ist hier ex vivo dicing, d.h. die siRNAs werden aus polycistronischen Vorläufern ex vivo durch Prozessierung mit dem Dicer gewonnen, oder es werden chemisch synthetisierte siRNAs verwendet. Ein interessanter Ansatz bietet auch die folgende Beobachtung: das Gen SID-1 aus *Caenorhabditis elegans* ist ein Transmembranprotein, welches den zellulären uptake von dsRNA ermöglicht (Evan et al 2003). Es wäre natürlich von äußerstem Interesse ein menschliches Analogon dazu zu finden.

1.2.1 Vergleich der verschiedenen RNA-Liganden

Für welche RNA-Liganden man sich schließlich entscheidet hängt von unterschiedlichen Parametern wie Zelltyp, Konzentration des Agens, transfektions Technik u. a., ab. Es konnte gezeigt werden, daß bei der Verwendung von siRNAs diese einen längeren und einen stärkeren Effekt auf die Repression ihres Zieles haben als Antisense-ODNs oder Ribozyme (Miyagishi et al 2003, Kretschmer-Kazemi et al 2003, Grunweller et al 2003, Xu et al 2003). Auch ist die optimale IC₅₀ Konzentration von siRNA um den Faktor 100 bis 1.000 geringer als bei der Verwendung von Antisense-ODNs gegen das gleiche Ziel (Eckstein et al 2000). Alle drei Methoden besitzen auch nicht spezifische Effekte auf die Genexpression. Besonders Phosphorothioat-modifizierte, können mit endogenen Proteinen interagieren und dadurch toxische Effekte haben (Lebedeva et al 2001). Ribozyme interagieren ohne Vermittler mit dem Ziel, toxische Effekte können besonders bei chemisch modifizierten Ribozymen auftreten. Die geringe Konzentration an siRNA und die durch den RISC-komplex vermittelte Hybridisierung verringert das Potential von nicht spezifischen Effekten. Es wurden dennoch in einigen Versuchen nicht spezifische Effekte auf die Genexpression durch siRNA beobachtet (Persengiev et al 2004, Sledz et al 2003, Bridge et al 2003).

1.3 Niedermolekulare Substanzen als RNA Liganden

Neben der Verwendung von Nukleinsäuren (Ribozyme, siRNA, Antisense-ODNs) besitzen auch niedermolekulare Substanzen die Möglichkeit spezifisch RNA zu binden. Gut untersucht sind Aminoglykosid-Antibiotika, welche spezifisch mit der 16S rRNA (Moated et al 1987) interagieren können und auf diese Weise die Proteinbiosynthese modulieren.

Das gängige Grundgerüst für die meisten Aminoglykoside ist 2-Deoxystreptamin (2-DOS), einem Aminozyklitol. Dieses Grundgerüst wird typischerweise an der 4- und 5- oder 5- und 6-Position glykosiliert und man erhält ein charakteristisches Aminoglykosid. Streptomycin war das erste aminoglykosidische Antibiotikum. Moazed und Moller zeigten 1987, daß diese Substanz mit einer spezifischen Region der 16s rRNA wechselwirkt. Green konnte 1993 darüber hinaus zeigen, daß diese Substanz auch die Interaktion zwischen dem HIV-1 Rev-Protein und dem Rev-Response-RNA-Element (RRE) stört. Streptomycin interagiert dabei nur mit dem Phosphatrückgrat der RNA. Da dieses stark negativ geladen ist, bekommt die elektrostatische Wechselwirkung mit den Aminoglykosiden eine besondere Bedeutung.

Bei einer Untersuchung wurde die wichtige Rolle von Amingruppen deutlich. Diese bei physiologischen pH-Wert positiv geladenen Gruppen können mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der RNA elektrostatisch interagieren. Jedoch müssen diese Gruppen in

einer bestimmten räumlichen Anordnung zueinander stehen, so daß diese spezifisch mit der RNA interagieren können.

Auch Hydroxylgruppen können die Affinität beeinflussen. So ist z. B. Kanamycin B bei der Inhibierung von Gruppe I selbst spleißenden Introns 20fach weniger aktiv (Ahsen et al 1991) als Tobramycin, seinem 3'-Deoxy-Derivat. So kann durch Änderung von Hydroxylgruppen zu Amingruppen die RNA Bindeaffinität gesteigert werden (Wang et al 1998).

Arginine spielen bei der Protein-RNA Interaktion eine wichtige Rolle. So besitzt das Rev-Protein an der RNA Bindestelle einen hohen Anteil an Argininen. Diese Aminosäure ist in der Lage, da sie basisch und planar ist, mit der RNA durch Wasserstoffbrücken und durch Stacking zu interagieren.

Mit dieser Erkenntnis wurden die Aminogruppen der Aminoglykoside teilweise durch Guanidiumgruppen ersetzt. Dadurch sollte eine verbesserte Interaktion mit der RNA durch unterschiedliche Bindungsmodi erreicht werden. Bei ersten Tests mit HIV-infizierten Zellen konnten sie dies auch unter Beweis stellen: Die Guanidinoglykoside inhibieren die HIV-Replikation um den Faktor 100 besser, als das entsprechende Aminoglykosid (Baker et al 2000).

Was bei diesen Experimenten deutlich wird, ist die Tatsache, daß es von Vorteil für die Interaktion mit der RNA ist, unterschiedliche Bindungsmodi zu besitzen.

1.3.1 Aminoglykosid Derivate als Liganden gegen die RNA RRE Struktur

Während des Replikationszyklus von HIV spielt die Interaktion des Rev Proteines mit der RRE RNA-Struktur eine wichtige Rolle. Dieses Protein erleichtert den Export der HIV RNA aus dem Hostkern und schützt die virale RNA gleichzeitig vor dem Spleißen. Ein Neomycin-Acridin Derivat, neo-S-Acridin kann diese Struktur binden und ist der stärkste bekannte Kompetitor für die Rev-RRE Interaktion (Kirk et al 2000). Hier wurde erstmals gezeigt, daß niedermolekulare Substanzen RNA-Protein Interaktionen stören können und daß synthetische Liganden eine hohe RNA Affinität erreichen können. Durch die Amingruppen wird das RNA Rückgrat elektrostatisch gebunden, das Acridin-Ringsystem besitzt die Möglichkeit zwischen den RNA Basen zu interkalieren, darüber hinaus können Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Durch Kombination von diesen verschiedenen Bindungsmodi kann die Affinität zu RNA moduliert werden.

1.3.2 Peptidliganden für die Psi-RNA Struktur von HIV

Die Psi-RNA Struktur von HIV repräsentiert das Verpackungssignal, welches an der 5'-UTR der ungespleißten RNA von HIV-1 Molekülen vorkommt. Das Signal ist für die spezifische Verpackung von zwei viralen RNA Genomen im Laufe der Virusreifung zuständig. Durch Phage Display wurden unterschiedliche Motive gefunden, welche diese Struktur binden können. Das Peptid HWWPWW-NH₂ bindet diese Struktur mit einem K_D von 25 μ M (CD). Auffällig ist die große Zahl an stark hydrophoben Tryptophanen. Durch das Indolringsystem bindet dieses Peptid wahrscheinlich auch durch Stacking die RNA Struktur (Pustowka et al 2003).

1.3.3 Peptid-Chinolin-Konjugate als RNA Liganden

RNA-Liganden können durch unterschiedliche Weise mit der RNA interagieren. Ein Hauptproblem dabei ist es, Selektivität für eine bestimmte RNA zu erreichen. In Fall der Interkalatoren ist es notwendig, die Bindungsaffinität dieser Gruppe zu kontrollieren. Wenn die Affinität des Interkalators zu stark im Vergleich zu den restlichen an der Bindung beteiligten Gruppen ist, dann stackt dieses Molekül unspezifisch weitere Bereiche auf der Nukleinsäure. Peptid-Chinolin-Konjugate zeigen eine mögliche Lösung für dieses Problem.

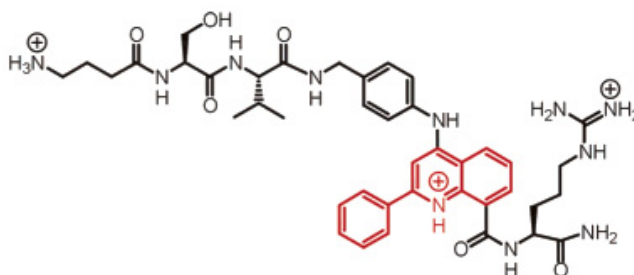


Abb. 1-5. Diese Bild zeigt das Peptid-Chinolin-Konjugat N-Abu-Ser-Val-PheQ-Arg-C (Abu: 4-Aminobuttersäure; PheQ: ist die 4,8-substituierte 2-Phenylchinolin Gruppe). Es interkaliert schlechter als das entsprechende Acridin-Konjugat, ermöglicht aber in Kombination mit den restlichen Gruppen eine bessere Kontrolle über die Bindungsaffinität des Interkalators.

Die Affinität des Interkalators des in Abbildung 1-5 gezeigten Peptid-Quinolin-Konjugates ist geringer als die Affinität des entsprechenden Acridin-Konjugates. Dadurch erreicht man eine Feinsteuerung der Bindungsaffinität, die schließlich zu einer besseren Selektivität des Liganden führt.

1.3.4 Das therapeutische Potential von Peptiden

Peptide können ähnlich wie Aminoglykoside spezifisch mit der RNA interagieren. Um diese als Therapeutikum zu verwenden, müssen diese jedoch zur Gewinnung von besseren pharmakologischen Eigenschaften modifiziert werden. Eines der auftauchenden Probleme ist die Bioverfügbarkeit der verabreichten Peptide, da die Halbwertszeit und die mögliche therapeutische Konzentration eine große Rolle spielen. Durch verschiedene Modifikationen der Seitenketten oder durch Komplexierung mit einer Trägersubstanz wurden diese resistent gegen Degradation gemacht.

Als Beispiel für eine solche Modifikation wurde das Parathormon (PTH) durch eine modifizierte Hydrathülle und durch einen Polymercarrier oral verfügbar (Seghal et al 2002). Durch die Verpackung in Liposomen können Peptide ebenfalls vor dem Abbau geschützt werden. Diese Liposomen können dann z. B. über hydrophile Polymere mit Antikörpern konjugiert werden, was ein spezifisches Targeting der Vesikel ermöglicht (Spear et al 2001, Zhang et al 2001).

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, aus einem biologisch wirksamen und interessanten Peptid-Aptamer ein entsprechendes Peptidmimetikum abzuleiten. Zum einen kann es sich dabei um peptidische Strukturmimetika handeln, bei denen die biochemischen und biophysikalischen Nachteile der natürlichen Peptid-Aptamere durch chemische Modifikationen überwunden werden.

Zum anderen kann es sich um nicht-peptidische Mimetika handeln, welche die dreidimensionale Struktur des nativen Peptides nachahmen und so beispielsweise wichtige Domänen des Targets inhibieren (Breinbauer et al 2002, Liu et al 2002, Rich et al 2002).

In diesem Fall können die Peptidsequenzen als Leitstrukturen zur Etablierung ganzer niedermolekularer Bibliotheken dienen. Diese niedermolekularen chemischen Substanzen haben zusätzliche Vorteile aufgrund ihrer höheren Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit (Breinbauer et al 2002, Klebe et al 2000, Leung et al 2000)

1.3.5 Vorteile von RNA-Liganden

Das RNA Molekül spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von biologischen Prozessen. Niedermolekulare Substanzen besitzen die Fähigkeit, strukturelle RNA-Bereiche zu binden. Dadurch können zelluläre Funktionen verändert werden (Tor et al 1999). Die Resistenzentwicklung bei RNA bindenden Molekülen verläuft langsamer als bei Protein bindenden Molekülen (Sucheck et al 2000). Bei Proteinen bieten sich funktionelle Domänen als Interaktionspartner für synthetische Moleküle an. Darunter fallen natürlich auch die

katalytischen Zentren selbst. Häufig ist jedoch dieser Bereich bei z. B. ATP-Bindetaschen stark konserviert, so daß man auch die Funktion von unerwünschten Proteinen verändert. Die RNA bietet in diesem Fall eine gute Lösung an. Bestimmte sequenzabhängige Strukturen sind charakteristisch für eine bestimmte RNA. So ist es auch möglich, RNA Sequenzen, welche nur in veränderten Zellen vorkommen, als Target zu nehmen und spezifisch zu binden. So bieten Translokationsbereiche, wie BCR-ABL eine gute Wahl, da diese nur in den transformierten Zellen vorkommen (Sucheck et al 2000).

1.4 Die BCR-ABL positive Leukämie

Die BCR-ABL positive Leukämie entsteht durch eine chromosomale Abnormalität, der Translokation t(9;22). Durch diese Translokation bedingt entsteht eine chimäre RNA, welche für ein Fusionsprotein kodiert. Der Bereich um den Translokationsbruchpunkt kann nur in den transformierten Zellen gefunden werden und bietet somit eine gute Basis für eine molekulare Intervention an dieser Stelle. Die Philadelphia Translokation ist somit als Modellsystem für die Entwicklung von RNA-Liganden gut geeignet.

1.4.1 Die Philadelphia Translokation

Die erste chromosomale Abnormalität wurde 1959 von Peter Nowell und David Hungerford beschrieben. Sie machten die Beobachtung, daß CML Patienten eine normale Anzahl von Chromosomen besitzen, jedoch ein Chromosom eine Deletion trägt (Nowell et al 1960). Dieser Sachverhalt wurde von weiteren Krebsforschern bestätigt und fand dann Anwendung in der Diagnostik dieser Krankheit. Dieser Marker wurde nun, nach dem Entdeckungsort, Philadelphia Chromosom oder kurz Ph genannt. Man ging zunächst davon aus, daß eine chromosomale Deletion diese Krankheit verursachte.

Erst 1972 konnte Rowley zeigen, daß es sich um eine reziproke Translokation zwischen dem langen Arm von Chromosom 9 und dem langen Arm von Chromosom 22 handelt (Rowley et al 1973). Es konnte später bewiesen werden, daß diese t(9;22) BCR-ABL Fusion essentiell für die Entwicklung der CML ist (Jaffe et al 2001).

Auch bei der ALL konnte diese Translokation nachgewiesen werden. Während der Name BCR von dem Wort „breakpoint-cluster-region“ abgeleitet wurde, da die Translokation immer innerhalb einer 5,8 kb großen Region (Groffen et al 1984) stattfindet, steht das abl Gen für eine gut untersuchte Tyrosinkinase (Witt et al 1980). Die Aktivität dieser Kinase ist bei ALL stark erhöht und bei CML schwächer erhöht (Konopka et al 1984). Um die Rolle dieses BCR-

ABL Fusionsprotein zu verstehen, wurden Tierversuche durchgeführt. Es wurden Mäuse mit einem Retrovirus transduziert, welcher das bcr-abl Gen enthält.

Es war zu beobachten, daß dieses Fusionsprotein für die Entstehung von myeloproliferativen Syndromen ausreichend ist (Daley et al 1990). Dies unterstreicht die Wichtigkeit dieser Translokation im Rahmen der Pathogenese von CML und ALL. Inzwischen ist bekannt, daß es verschiedene BCR-ABL Translokationsbereiche gibt, die den Charakter der Krankheit verändern (Abb. 1-5).

Der Bruchpunkt innerhalb des abl Genes liegt in einem weiten Bereich, der Größer als 300 kb ist. Er kann „upstream“ vor dem alternativen Exon 1b, „downstream“ nach dem alternativen Exon 1a oder – am häufigsten – zwischen diesen beiden liegen.

Ungeachtet dessen liefert Spleißen dieses primären hybrid Transkriptes eine mRNA, in welcher die BCR-Sequenz an das ABL-Exon a2 fusioniert ist.

Im Gegensatz dazu gibt es bei BCR drei so genannte „breakpoint cluster region“ (bcr) (Abb. 1-5). Bei den meisten Patienten mit Chronischer myeloischer Leukämie, die 20% aller Leukämien ausmacht und bei etwa 30% der Patienten mit Philadelphia positiver Akuten Lymphatischen Leukämie, kommt der Bruchpunkt innerhalb eines 5,8 kb großen Bereiches vor, der die BCR Exons 12-16 (b1 bis b5) umfaßt. Dies wurde als die major breakpoint cluster region (M-bcr) definiert. Bedingt durch alternatives Spleißen entstehen Fusionstranskripte mit entweder b2a2 oder b3a2 Verbindungen. Von dieser mRNA wird ein 210kD chimäres Protein translatiert.

Bei den restlichen Patienten mit ALL konnte eine andere Art von Translokation nachgewiesen werden. Der Bruchpunkt liegt zwischen den Exons e2' und e2 und wird minor breakpoint cluster region (m-bcr) genannt. Das Translationsprodukt dieser e1a2 mRNA ist ein 190 kD Protein. Ein dritter Bruchpunkt konnte bei der seltenen Chronischen Neutrophilen Leukämie in einigen Fällen nachgewiesen werden. Dieser μ -bcr Bruchpunkt genannte Bereich liefert ein Fusionsprotein mit 230 kD.

Aufgrund der Invarianz der ABL-Sequenz kann man schließen, daß diese das transformierende Element enthält, während die unterschiedliche Größe von BCR den Phänotyp der Krankheit bestimmt.

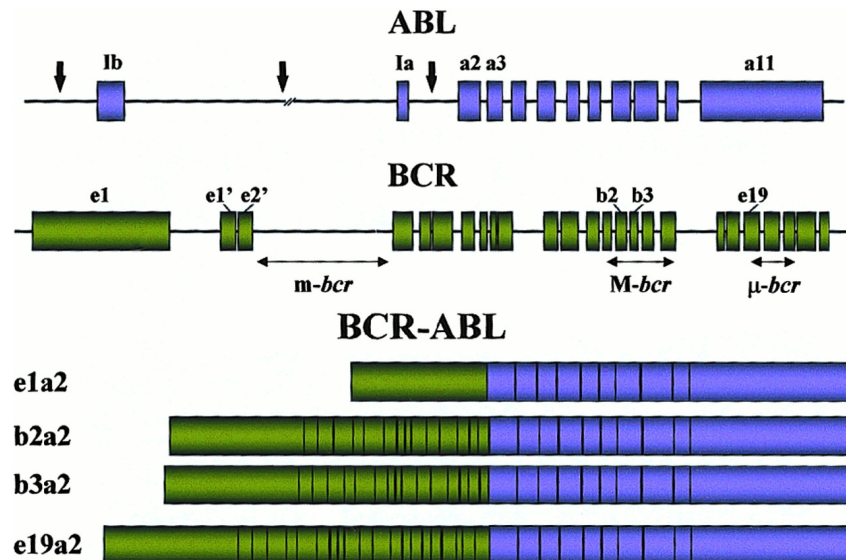


Abb. 1-6. Auf mRNA-Ebene werden unterschiedlichen Fusionstranskripte beobachtet, welche mit bestimmten Phänotypen der Leukämie assoziiert sind. Die beobachteten Bruchpunkte sind mit Pfeilen angedeutet. Die Fusionstranskripte b2a2 und b3a2 kodieren für ein 210kD BCR-ABL Protein. Dieses Protein wird bei der CML und bei 30% aller ALL beobachtet. Das Transkript entsteht durch eine Translokation im Major-bcr-Bereich (M-bcr). Eine Translokation im minor-bcr-Bereich (m-bcr), liefert eine e1a2 bcr-abl mRNA, welche für ein 190kD schweres BCR-ABL Protein kodiert. Das e19a2 RNA Transkript kodiert für ein 230kD schweres BCR-ABL Protein und tritt bei der seltenen CNL auf. Generiert wird dieses Transkript durch eine Translokation im μ-bcr-Bereich.

1.4.2 BCR-ABL und Leukämie

Die Ph chromosomale Translokation wird in 30 % von Adulten und in 5 % bei Kindern mit ALL beobachtet (Catovsky et al 1979). Etwa die Hälfte der Patienten mit Ph positiver ALL trägt die M-bcr Translokation. Eine weitere 190kD ABL Tyrosinkinase konnte aus Ph+bcr-ALL Blasten nachgewiesen werden (Chan et al 1987, Clark et al 1987).

Hier liegt der Bruchpunkt im m-bcr Bereich. Ein p230 BCR-ABL Fusionsprotein konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Saglio et al 1990). Dieses Protein entsteht durch eine Translokation im μ-bcr-Bereich und ist assoziiert mit Ph positiver CNL.

1.4.3 Akute lymphatische Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine maligne Erkrankung lymphatischer Vorläuferzellen aus Knochenmark, Thymus oder lymphatischem Gewebe. Die unkontrollierte Expansion der lymphatischen Blasten führt zu einer Verdrängung der normalen Blutbildung mit nachfolgender hämatopoietischer Insuffizienz sowie zur Ausschwemmung lymphatischer Blasten in das periphere Blut und zur Infiltration anderer Organe.

Die Gesamtinzidenz der ALL liegt bei 1,1 Fällen bezogen auf 100.000 Einwohner im Jahr.

Am häufigsten tritt die ALL im Kindesalter (5,3/100.000) und im Alter über 80 Jahren (2,3/100.000) auf. Die häufigste klonale Chromosomenaberration bei ALL entsteht bei der Translokation t(9;22) durch die Fusion des ABL-Genes (Chromosom 9) mit dem BCR-Gen (Chromosom 22). Dies führt zur Expression eines aberranten Fusionsproteins BCR-ABL mit erhöhter Kinaseaktivität. Die Einteilung der ALL wird gemäß der FAB (French-American-British)-Klassifikation ermittelt. Dabei werden lichtmikroskopisch die Zellen eines Knochenmarkausstrichs untersucht. Tab. 1-1 gibt einen Überblick auf die Klassifizierungen.

	ALL Klassifikation nach FAB
L1	Blastenzellen klein, uniform, hohes Verhältnis von Kern zu Zytoplasma
L2	Blastenzellen größer, heterogen, niedriges Verhältnis von Kern zu Zytoplasma
L3	vakuolisierte Blasten, basophiles Zytoplasma

Tab. 1-1. Die Einteilung der ALL erfolgt gemäß der French-American-British-Klassifikation. Zellen eines Knochenmarkausstrichs werden hierzu lichtmikroskopisch untersucht. Ausgehend von dieser Einteilung und weiteren Parametern werden unterschiedliche Behandlungsmethoden verwendet.

Darüber hinaus werden die Zellen Immunphänotypisiert sowie molekulargenetisch untersucht. Dies erlaubt die weitere Klassifizierung der Leukämie in u. a. B-Linien-ALL, B-Vorläufer-ALL, reife B-ALL, reife T-ALL mit jeweils unterschiedlicher Symptomatik und Behandlungsstrategie.

1.4.4 Chronische myeloische Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie (CML) resultiert aus einer malignen Erkrankung einer pluripotenten Stammzelle, welche zu einer unkontrollierten Expansion myeloischer Zellen bei erhaltener Differenzierungsfähigkeit führt. Die Inzidenz der CML beträgt 1 auf 100.000 Einwohner pro Jahr und macht etwa 20 % aller Leukämien im Erwachsenenalter aus. Es sind alle Altersgruppen betroffen, der Häufigkeitsgipfel liegt im 5. bis 6. Lebensjahrzehnt. Etwa 60 % der Erkrankten sind männlich. Bei 95 % der Patienten ist die charakteristische reziproke Translokation t(9;22), das Philadelphia-Chromosom, nachweisbar. Mit zunehmender Dauer der Erkrankung treten häufig weitere chromosomale Aberrationen auf. Der Verlauf der CML kann in drei Phasen eingeteilt werden. Einer chronischen Phase, welche relativ symptomarm verläuft und im Median 4 Jahre andauert, einer Akzelerationsphase, welche einige Monate dauert in welcher sich die Leukozyten rasch

verdoppeln und in die Blastenkrise überführt. Bei Auftreten der Blastenkrise beträgt das Überleben nur wenige Monate.

1.5 Molekulare Ansätze einer Therapie bei Ph+ Leukämien: STI 571

STI571 (Imatinib, Glivec) ist der erste selektive Inhibitor für eine Tyrosinkinase. STI571 besitzt eine starke Aktivität bei dem BCR-ABL Onkogen (Druker et al 1996). Darüber hinaus werden ABL, die RTKs PDGFR und KIT ebenso inhibiert. KIT spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von gastrointestinalen stroma Tumoren (GIST) (Joensuu et al 2001) und ist hier ebenfalls indiziert.

STI571 kompetiert die ATP Bindetasche von BCR-ABL und verhindert auf diese Weise die Phosphorylierung von Substraten. Trotz all der Ähnlichkeit von ATP-Bindetaschen ist es erstaunlich, daß ein solch potenter Wirkstoff gefunden werden konnte. Der Erfolg dieses Wirkstoffes begann mit der klinischen Phase I im Jahr 1998. Die Daten konnten zeigen, daß ab einer Konzentration von 300mg STI571 pro Tag sowohl in der chronischen Phase als auch in fortgeschrittenen Stadien Remissionen erreicht werden können. In der chronischen Phase wurden komplette hämatologische Remissionen bei 53 von 54 Patienten erreicht. In der myeloischen Blastenkrise wurden hämatologische Remissionen bei 21 von 38 Patienten beobachtet, davon vier komplette hämatologische Remissionen. Die Nebenwirkungen waren minimal.

Im Moment läuft die klinische Phase III, bei welcher eine primäre Monotherapie mit STI571 mit der Standardtherapie bei CML-Patienten verglichen wird. Ergebnisse hier liegen jedoch noch nicht vor. Es werden aber auch additive und synergistische Effekte bei einer Reihe von Kombinationsversuchen mit STI571 beobachtet. Auch diese Kombinationstherapien sind zur Zeit in der klinischen Phase. Diese Kombinationstherapie ist auch wichtig um Resistenzentwicklungen der Zellen zu erschweren.

Es sind unterschiedliche Resistenzmechanismen beschrieben, mit denen die Zellen sich der Wirkung des Wirkstoffs entziehen: Protein Überexprimierung, Gen Amplifizierung, Multidrug Resistenz, sowie Bindung zu Serumproteinen (le Coutre et al 2000, Weisberg et al, 2000, Mahon et al 2000, Gambacorti-Passerini et al 2000/2001, Krysztal et al 2001). Darüber hinaus beobachtet man bei 6 von 9 Patienten Mutationen innerhalb der BCR-ABL RNA (n944 C → T). Dieser Austausch führt zu einer Mutation innerhalb von ABL (T315I), welche zu Folge hat, daß die für STI571 wichtige Wasserstoffbrücke zu T315 nicht mehr ausgebildet werden kann, und durch die größere Seitenkette des Isoleucins entsteht eine sterische Hinderung der Bindung von STI571.

Trotz all dieser Probleme ist nun die Tür aufgestoßen für eine Vielzahl neuer von STI abgeleiteten Derivate. Der mögliche Nachfolger PD180917 blockiert BCR-ABL und ebenso die DNA-Bindung von STAT5 (Huang et al 2002), einem wichtigen Signaltransduktionsprotein, welches von BCR-ABL aktiviert wird. Auch STI 571 resistente Zellen werden durch PD180917 inhibiert.

1.5.1 Aminoglykoside als BCR-ABL mRNA Binder

Sucheck et al haben gezeigt, daß auch Aminoglykoside dem BCR-ABL Bruchpunkt binden können (Sucheck et al 2000). Untersucht wurde das Bindungsverhalten von verschiedenen Aminoglykosiden mit oncogener RNA wie BCR-ABL und PAX3-FKHR. Die höchste Affinität für diese beiden Strukturen zeigte Neomycin B. Die BCR-ABL RNA und auch die PAX3-FKHR RNA wurden jeweils mit einem K_D Wert von $1,5 \mu\text{M}$ (SPR) gebunden. Neomycin zeigt also Bindung an die RNA, jedoch eine unselektive. Im folgenden wurde versucht, ausgehend von Neamin als Grundgerüst, affinere und spezifischere RNA-Binder zu synthetisieren. Es wurden zwanzig verschiedene Derivate synthetisiert und die K_D Werte für die beiden RNAs ermittelt. Ein Derivat mit einer 6-Aminoquinolin-Gruppe zeigt zum einen nanomolare Bindeaffinität zu BCR-ABL und diese RNA wurde spezifischer gebunden als die PAX3-FKHR RNA. (K_D : $0,52 \mu\text{M}$ zu $4 \mu\text{M}$ [SPR]).

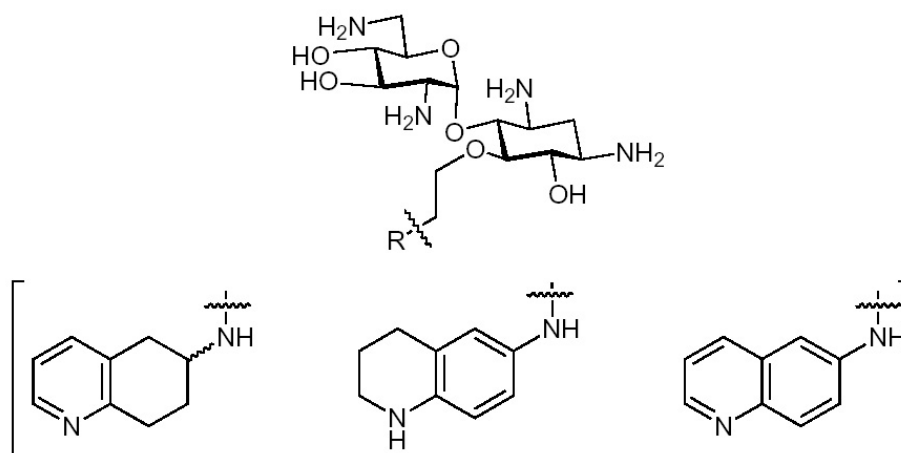


Abb. 1-7. Neamin mit einer 6-Aminoquinolingroupue bindet die BCR-ABL RNA spezifischer als die PAX3-FKHR RNA. Die höhere Bindeaffinität kann Ursache der Interkalation der Aminoquinolin-Gruppe mit der RNA sein. Insofern bindet dieses Derivat mit unterschiedlichen Methoden an die RNA. Dadurch, daß eine Interkalation der BCR-ABL RNA zu einer höheren Bindeaffinität führt, kann man Rückschlüsse auf die Struktur dieser RNA machen. Sie benötigt strukturelle Bereiche, welche auch interkaliert werden können. (Abb. aus: Sucheck et al, 2000, Angew. Chem.Int. Ed, 2000, 39, No. 6)

Diese höhere Bindungsaffinität kann durch Interkalation mit der RNA erklärt werden. Insofern handelt es sich hier um ein gutes Beispiel für eine gemischte Bindung, bei welcher Aminogruppen mit dem Rückgrat der RNA interagieren und die Aminoquinolin-Gruppe die RNA durch Interkalation bindet. Gleichzeitig liefert diese Beobachtung wichtige Erkenntnisse über die strukturellen Eigenschaften der verwendeten RNAs. Die Länge und auch der GC-Gehalt sind bei beiden annähernd gleich. Jedoch scheint die BCR-ABL RNA eine rigidere RNA Struktur zu enthalten als die PAX3-FKHR RNA. Dies ermöglicht die Interkalation mit einer definierten Domäne der BCR-ABL RNA.

Es wurden dann allerdings keine weiteren Untersuchungen zum Bindungsort durchgeführt. Es wurden auch keine Experimente durchgeführt, welche den Einfluß dieser niedermolekularen Substanzen auf die Expression von BCR-ABL in biologischen Systemen beschreiben.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Philadelphia-Positiven Leukämien sind eine relativ häufige und sehr schwere Form von Leukämie. Etwa 20 % aller Leukämien im Erwachsenenalter machen die CML aus, die zu 95 % positiv für die Philadelphia-Translokation sind. 30 % aller ALL sind ebenfalls positiv für diese Translokation. Eine Heilung bei Leukämien liefert bisher nur eine Knochenmarktransplantation, welche jedoch nur für die wenigsten Patienten aufgrund der HLA-Biokompatibilität zur Verfügung stehen.

Die Standardbehandlung mit Chemotherapeutika interagiert mit allen schnell teilenden Zellen, so daß hier starke Nebenwirkungen zu beobachten sind. Die geringe Selektivität von myelotoxischen Substanzen führt auch dazu, daß diese Medikamente das gesunde Knochenmark angreifen und die Patienten unter einer schweren und langanhaltenden Knochenmarkinsuffizienz leiden.

Inzwischen gibt es einige niedermolekulare Substanzen, welche spezifisch mit den leukämischen Zellen interagieren können. Das verfügbare STI 571 kompetiert die ATP-Bindetasche von BCR-ABL, PDGFR und KIT. Dadurch lassen sich Philadelphia positive Leukämien zunächst recht gut behandeln. Leider zeigen die leukämischen Zellen nach einer gewissen Zeit Resistenzen gegen dieses Medikament. Dieses Problem kann dadurch angegangen werden, daß man eine Kombinationstherapie angewendet. Eine solche Therapie führt bei der Behandlung von HIV zu weniger Resistenzen, als bei der Verwendung von nur einem Wirkstoff.

Obwohl es inzwischen neben der Chemotherapie verfügbare Alternativen gibt, ist es doch notwendig nach weiteren Therapieformen zu suchen.

Translokationsbereiche auf mRNA-Ebene bieten einen einzigartigen, wichtigen Angriffspunkt für RNA-Liganden. Die Sequenz um den Translokationsbereich ist nur in den transformierten Zellen zu finden, so daß diese als ein gutes Target für RNA-Liganden-Interaktion dienen können.

Im Rahmen dieser Arbeit soll überprüft werden, ob der Sequenzabschnitt am Translokationsbruchpunkt eine Struktur ausbildet, welche als Zielstruktur für Peptidliganden dienen kann. Anschließend soll für diesen Bereich Peptide isoliert werden, welche spezifisch mit dieser Struktur interagieren können. Der Bindungsort der gefundenen Peptide soll durch RNA Mutanten charakterisiert werden. Schließlich ist der Einfluß der Peptide auf die Translation auf ein Reporterkonstrukt durch einen In vitro Test zu charakterisieren. Mit diesem vorgehen sollte es möglich sein, strukturelle Domänen einer beliebigen mRNA zu finden und Peptide zu selektionieren, welche mit diesem Bereich spezifisch interagieren können.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Agarosegel-Apparatur	Life Technologies
ALFexpress™	Amersham Biosciences
Analysenwaage, R 160 P-D1	Sartorius
Auslaufpipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Becton Dickinson
Autoklav	Integra Biosciences
CD-Spektrometer, Jasco J810	Jasco
ConFoCor II	Carl Zeiss
Elektrophoresekammern	Life Technologies, BioRad
Gel-Photografier-System	BioRad
Gelkammern, Agarose	BioRad
Gelkammern, SDS	BioRad
Heizblock	Techne
Immunomagnetische Säulen	Miltenyi Biotec
Kühlschrank (4 °C, -20 °C)	Liebherr
Lumistar Galaxy	BMG Labtech
Magnetrührer	Janké & Kunkel
Magnet für µMACS	Miltenyi Biotec
Mikrowelle	Sharp
PCR-Cycler, Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer
pH-Meßgerät	Knick Calimatic 761

Pipettenspitzen	Greiner
Pipettenspitzen, gestopfte	Rotilab
Pipettierhilfe, elektrisch	Hirschmann
Polypropylen-Röhrchen	Falcon
Power Supplies	Life Technologies, BioRad
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Sarstedt
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Falcon
Schüttelinkubator, Brunswick Scientific G25	Nunc, Cellstar
Speedvac	Bachofer
Spektrophotometer	BioRad
Sterilfilter (0,22 und 0,45 µm)	Millipore
Thermometer	Roth
Tiefkühltruhe (-80 °C)	Revco
Zentrifugen	Biofuge 13, Heraeus
	Megafuge 1.0R, Heraeus
	Labofuge 400, Heraeus
	2k15, Sigma
	5415D, Eppendorf
	Ja-20/10 Rotoren, Beckmann
Transilluminator	UVP
Vakuumpumpe	Bachofer
Vortexer	Janké & Kunkel
Wasserbad	GFL-Juloba

2.2 Chemikalien und Biochemikalien

5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-d-Galactopyranosid (Xgal)	Sigma
Aceton	Roth
Acrylamide/Bis 19:1 40 % (w/v) Lösung	Ambion, Roth
Agarose	Sigma, Roth
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Roth
Borsäure	Roth
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Brilliant Blue R (Coomassie Blau)	Roth
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Sigma
Chloroform	Roth
Desoxynucleotide (dNTP's)	Pharmacia
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessig-säure (EDTA)	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Sigma
Glycogen	Roche
GMPS	Herr Scherr, Frankfurt

Harnstoff	Roth
Helipur	B.Braun
Isopropanol	Roth
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumacetat	Roth
Kaliumhydroxid	Sigma
Künstliche Nuklease	Dr. C.D. Roussev, UNI Frankfurt am Main
LB-Agar (Lennox I Agar)	Life Technologies
LB-Broth Base (Lennox L Broth Base)	Life Technologies
Magnesiumchlorid	Roth
N-(biotinoyl)-N'-(iodoacetyl)ethylene diamin	Molecular Probes
n,n Dimethylformamide	Sigma
Natriumazid	Sigma
Natriumbicarbonat	Sigma
Natriumchlorid	Sigma
Natriumiodid	Sigma
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogen-phosphate Hydrate	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Phenol	Roth
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Biometra
Polyethylenglycol-8000	Sigma
Polyoxyethylenesorbitan Monolaureat (Tween 20)	Sigma

Ribonucleotide (rNTPs)	Promega, Ambion
Rnasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega
Salzsäure	Roth
Straptavidin	Sigma, NEB
SUPERase Ln™ RNase Inhibitor	Ambion
TE-saturated (ph8) phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)	Roth
Tetramethylethyldiamin (Temed)	Roth
Tetryacylin	Roth
Tris	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Trizma® Hydrochloride	Sigma
tRNA	Ambion

Chromophore

Cy5	Dr. Hey, UNI Frankfurt am Main
Cy5-Oligo	Biospring
Cy5-Primer für Reverse Transcriptase	Biospring
Fluorescein	Molecular Probes
Fluorescein-Oligo	Biospring
R6G	Aldrich
R6G-Oligo	Biospring

2.3 Kits

Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
GeneAmp® RNA PCR Core Kit	Applied Biosystems
JETstar Plasmid Purification System	Genomed
Minielute Reaction Cleanup Kit	Qiagen
µMACS Streptavidin Kit	Miltenyi Biotec
Ph.D. - 12™ Phage Display Peptide Library Kit	NEB
Ph.D. – 7™ Phage Display Peptide Library Kit	NEB
Quick Ligation Kit	NEB
RiboMAX™ – T7	Promega
TnT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems	Promega
Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated	Promega
T7 RiboMAX™ Express	Promega
T7-MEGAshortscript™	Ambion

2.4 Enzyme

MuLV RT	Roche
<i>NheI</i>	NEB
Quick T4 DNA Ligase	NEB
RNase A	Sigma
RNase T1	Ambion

RNase T2	Sigma
RNase V1	Ambion
RQ1 RNase-Free DNase	Promega
SuperScript™ II RT	Invitrogen
T4 Polynucleotide Kinase	NEB
T7 RNA polymerase	Promega, Ambion
Thermostable Inorganic Pyrophosphatase	NEB
<i>XmnI</i>	NEB

2.5 Bakterienstämme

E.coli Subcloning Efficiency DH5 α (Invitrogen)

Genotyp: F- ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1

E.coli ER2738

Genotyp: F' lacIq Δ (lacZ)M15 proA+B+ zzf::Tn10(TetR)/fhuA2 supE thi Δ (lac-proAB) Δ (hsdMS-mcrB)5(rk-mk-McrBC-)

2.6 Phagenstämme

Male spezifischer coliphage M13, infiziert nur F+ Bakterien

2.7 Oligonukleotide

Die von Biospring, Frankfurt synthetisierten Oligonukleotide wurden für In-vitro-Transkriptionen, zur Markierung von transkribierter RNA, zum Klonieren und als Primer verwendet.

Name	Sequenz	Verwendungszweck
T7-Promotor	AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GC	23nt 43tm mw7030 Promotor für T7
Linker-Biotin	CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC C Mod 3'-Biotin	22nt 52tm mw6637 ODN für rcRNAs um sie am 5'-Ende mit Biotin zu versehen
Linker-Fluorescein	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GT Mod 5'Fluorescein	20nt 45tm mw6082 ODN für rcRNAs um sie am 3'-Ende mit Fluorescein zu versehen
1RC 400-460 nt	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTC GCC GCC ACG CTG GCG GGG GGT CCC CGG TCG TCC CGT TCC CCC GAC GCG GCT GCC CCG GGC CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T	124nt 80tm mw 38032 Struktur 1 für PhD – zum annealen mit B/F-Liner ODN –zum annealen mit T7
2RC 1518- 1554 nt	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTT CCA GGT GGC TCA GGT AAG TCT CCT CGC TAG CCA GGA CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T	100nt 73tm mw 30746 Struktur 2 für PhD
3RC 2144- 2181 nt	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTT GGC GCA GCT TGC GGG CCC CCT CCA CCA GCT CCA CCA CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T	100nt 75tm mw 30573 Struktur 3 für PhD
4RC 2708- 2750 nt	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTA CGA TGA CAT TCA GAA ACC CAT AGA GCC CCG GAG ACT CAT CAT CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T	106nt 72tm mw 32538 Struktur 4 für PhD
5RC 2776- 2856 nt b3a2 br	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTT GGA GTT CCA ACG AGC GGC TTC ACT CAG ACC CTG AGG CTC AAA GTC AGA TGC TAC TGG CCG CTG AAG GGC TTT TGA ACT CTC CAT GCT GTC CTA CTG ATT GCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT	144nt 75tm mw 44340 Struktur 5 b3a2br für PhD
6RC 3920- 3965 nt	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTG GAC TTG ATG GAG AAC TTG TTG TAG GCC AGG CTC TCG GGT GCA GTC CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T	109nt 73tm mw 33673 Struktur 6 für PhD
7RC 4256- 4285 nt	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTG GGG CCT GCA GCA AGG TAC TCA CAG CCC CAC CAT GCT GTC CTA CTG ATT GCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT	93nt 73tm mw 28567 Struktur 7 für PhD

Name	Sequenz	Verwendungszweck
8RC 4830-4870 nt	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTC AGG AGG CGG AGC AAG AGC GCA GGA AGC GCT TGC TGG AGC TCC ATG CTG TCC TAC TGA TTG CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT	104nt 74tm mw 32195 Struktur 8 für PhD
9RC 5flk	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTG GCG CGG CCG GCC TTA CCT GCG CCG CCG GGC TGC GCG CGG GGC CCG TCT CAG CGG CGG CGC GGC GGC CTC GCC AGG CCC GGC CCC GGG CGC CGG GCG GCC CCC ATG GCC CCG CGG CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T	178nt 86tm mw 54791 Struktur 9 (5'-flanking Region) für PhD
10RC b2a2	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTG CTA CTG GCC GCT GAA GGG CTT CTT CCT TAT TGA TGG TCA GCC CAT GCT GTC CTA CTG ATT GCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT	105nt 73tm mw 32283 Struktur 10 b2a2 Bruchpunkt für PhD
B2A2 wt (sense) NheI Adapter	CTA GCG CTG ACC ATC AAT AAG GAA GAA GCC CTT CAG CGG CCA GTA G	46nt 73tm mw 14162 Zum Klonieren in pRL-TK- Vektor. Für DLA Assay
B2A2 wt (antisense) NheI Adapter	CTA GCT ACT GGC CGC TGA AGG GCT TCT TCC TTA TTG ATG GTC AGC G	46nt 73tm mw 14139 Zum Klonieren in pRL-TK Vektor. Für DLA Assay
SeqPrm pRH-TK804	AAG TTG GTC GTG AGG CAC TG	20nt 54tm mw 6213 Sequenzier-primer für pRL-TK ab Stelle 804nt
M5 PduS sense Nhe	CTA GCA TCA ATA AGG AAG AAG CCC TTC AGC GGC CAG TAG	39nt 69tm mw 12019 Mutation 5 PduS zum Klonieren in pRL-TK
M5 PduS Antisense Nhe	CTA GCT ACT GGC CGC TGA AGG GCT TCT TCC TTA TTG ATG	39nt 51tm mw 11956 Mutation 5 PduS zum Klonieren in pRL-TK
1 DuL	TAC TGG CCA AGG GCT TCT TCC TTG GTC AGC CCT ATA GTG AGT CGT ATT	53nt 71tm mw 16279 mutation 1 DuL für IVT und CD-Titration
2 MoL	TAC TGG CCG CTG AAG GAT AAG CAC CTT ATT GAT GGT CAG CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA AT	63nt 72tm mw 19451 mutation 2 MoL für IVT und CD-Titration
3 MoS	TAC TGG CCG CTG GAG AGC TTC TTT CTC ATT GAT GGT CAG CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT	63nt 72tm mw 19399 Mutation 3 MoS für IVT und CD-Titration
4 MuS	TAG TCG CGC TGA AGG GCT TCT TCC TTA TTG ATG CGA CTA CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT	62nt 71tm mw 19094 Mutation 4 MuS für IVT und CD-Titration
5 PduS	TAC TGG CCG CTG AAG GGC TTC TTC CTT ATT GAT CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT	56nt 70tm mw 17216 Mutation 5 PduS für IVT und CD-Titration

Name	Sequenz	Verwendungszweck
6 PdoS	TAC TGG CCG CTG AAG GGC TTC TTA TTG ATG GTC AGC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT	59nt 72tm mw 18213 Mutation 6 PdoS für IVT und CD-Titration
K10	GCT ACT GGC CGC TGA AGG GCT TCT TCC TTA TTG ATG GTG AGC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT	65nt 68tm mw 20017 B2a2 Kompetitor RNA für FCS
Linker RG6	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GT Mod 5' Rhodamin 6G	20nt 45tm mw 6082 ODN zum laben der 10 RC RNAs für FCS, annealt „am Ende „ der RNA
3' Cy5 Linker	CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CX Mod 3' Cy5	23nt 52tm mw 6637 ODN zur Markierung der 10 RC RNAs für FCS, annealt „am Anfang“ der RNA

Tab. 2-1. Diese Tabelle beinhaltet alle verwendeten synthetisierten Oligonukleotide. Die Bezeichnung „RC“ bezieht sich auf die 10 unterschiedlichen RNA-Bereiche, welche durch MFold als RNA-Zielstruktur definiert wurde.

Diese konnten darüber hinaus mit den hier beschriebenen funktionellen ODNs hybridisiert werden.

[Molekulargewicht (mw) in Dalton, Schmelztemperatur (tm) in °C, PhD: Phage Display, IVT: In-vitro-Transkription, DLA: Dual-Luziferase-Assay]

2.8 Peptide

Die Peptide wurden von Coring Systems Diagnostix GmbH, Gernsheim, synthetisiert. Die Peptide wurden für die FCS-Kompetitionsexperimente, für die CD-Titrationsexperimente sowie bei den Expressionsexperimenten mit dem Reticulozytenlysat verwendet.

Name	Sequenz	Menge	Reinheit	Kontrollen
Peptid 12	NH ₂ -KHLHLHKGGG-C(MaleiBiot)-CONH ₂	7,2mg	96%	HPLC MS
Peptid 14	NH ₂ -NPEKVKMLYVEFGGG-C(MaleiBiot)-CONH ₂	6,5mg	89%	HPLC MS
Peptid 56a	NH ₂ -APPPSPTGGG-C(MaleiBiot)-CONH ₂	5,2mg	92%	HPLC MS
Scrl	NH ₂ -AAQTSTPGGG-C(MaleiBiot)-CONH ₂	5,7mg	95%	HPLC MS

Tab. 2-2. Von Coring wurden diese Peptide für die FCS- und CD-Experimente synthetisiert. Der Linker, welcher zwischen dem Peptid und dem Phagenprotein vorhanden ist, wurde hier in Form der drei Glycine am C-Terminus berücksichtigt. Die Peptide besaßen als funktionelle Gruppen ein Cystein sowie ein Biotin, welche es ermöglicht, Konjugate mit diesen Peptiden herzustellen.

2.9 Vektoren und Klonierungsstrategie: der pRL-TK Vektor und der Luziferase T7-Kontroll DNA Vektor (Promega)

Der pRL-TK Vektor von Promega besitzt die folgenden Eigenschaften:

HSV-TK Promotor 7-759. Upstream von der Renilla cDNA befindet sich der Herpes simplex Virus Thymidin Kinase Promotor. Dieser Promotor ermöglicht eine starke konstitutive Expression der Zielproteine in Zellen. In dieser Arbeit ist dieser Promotor nicht von Bedeutung.

Chimäres Intron 826-962. Transfektionsstudien zeigten, daß die Expression eines cDNA Inserts erhöht wird, wenn es von einem Intron flankiert wird.

T7-Promotor 1006-1024. Downstream von dem chimären Intron, direkt vor dem Anfang der Renilla cDNA, liegt der T7-Promotor. Von diesem Promotor ausgehend ist es möglich in einem In-vitro-Transkriptions/Translations-System aktive Renilla Luziferase zu erhalten.

Renilla Luziferase Reporter Gen 1034-1969.

SV40 late polyA Signal 2011-2212. Dieses polyA-Signal verursacht die Terminierung der Transkription durch RNA Polymerase II. Zusätzlich erhöht ein polyA-Tail die Stabilität der mRNA sowie die Translationseffizienz.

β -Lactamase Gen 2359-3219.

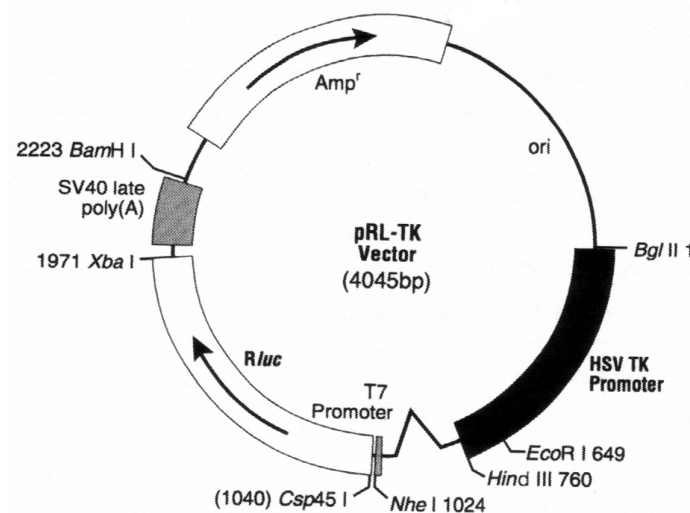


Abb. 2-1. Der pRL-TK Vektor von Promega wurde zur Klonierung des Reporterkonstruktes im Dual-Luziferase-Assay verwendet. In die *NheI* Restriktionsschnittstelle bei 1024nt wurde die b2a2-RNA Sequenz kloniert. Dadurch konnte von dem T7-Promoter eine RNA transkribiert werden, welche vor der Renilla Luziferase die b2a2-Sequenz enthält. Diese RNA wurde dann zur In-vitro-Translation verwendet. (Abb. aus: Promega pRL-TK Vektor)

Der pRL-TK Vektor von Promega wurde als Reporterkonstrukt im Dual-Luziferase-Assay verwendet. Zu diesem Zweck wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym *NheI* an der Erkennungssequenz bei 1024 nt verdaut. Anschließend wurden freie Phosphatgruppen des Vektors durch das CIP-Enzym entfernt. Das Insert, entweder die b2a2-wt- oder die b2a2-Mutante 5-Oligonukleotide wurden annealt und kinasiert. Anschließend wurde der Vektor mit dem Insert ligiert. Durch analytischen Verdau mit *XmnI* und Sequenzierung wurden positive Klone identifiziert und anschließend amplifiziert.

Tab. 2-3 gibt einen Überblick über die zu erwartenden Fragmente. Da es sich bei der Klonierung um keine gerichtete Klonierung handelt, mußten die vom analytischen Verdau positiven Klone sequenziert werden, um zu erkennen, ob das Insert in der richtigen Orientierung vorliegt.

Enzym	Konstrukt	Fragmente
<i>Xmn</i> I	pRL-TK	978, 3067
	pRL-TK-b2a2-wt	561, 978, 2552
	pRL-TK-b2a2-Mut5	561, 978, 2545

Tab. 2-3. Diese Tabelle beschreibt die entstehenden RNA-Fragmente, welche durch *Xmn*I-Verdau entstehen. Die Fragmentgrößen wurden bei der Suche nach positiven Klonen durch analytischen Verdau erhalten.

Der Luziferase T7-Kontroll DNA Vektor von Promega wurde als interne Kontrolle bei dem Dual-Luziferase-Assay verwendet. Es besitzt im Gegensatz zu dem Reporter-Konstrukt pRL-TK die Firefly Luziferase. Im Einzelnen besitzt das Plasmid die folgenden Eigenschaften:

Firefly Luziferase Gen 51-1700

Poly(A) (dA)₃₀ 1770-1799.

β-Lactamase Gen 2444-3304.

T7 RNA Polymerase Promotor 4315-3.

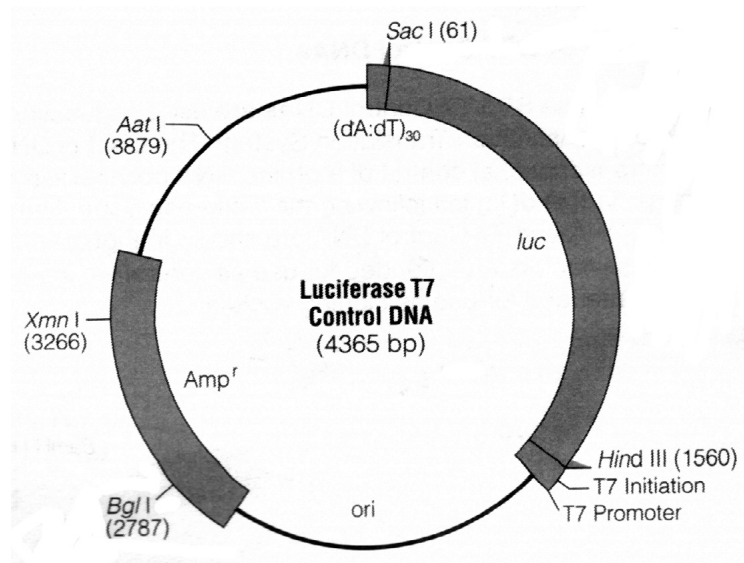


Abb. 2-2. Das Luziferase T7 Kontroll DNA Plasmid diente während des Dual-Luziferase-Assays als Template für die interne Kontrolle. Die Firefly-Luziferase steht hier unter dem T7-Promotor, so daß durch T7 In-vitro-Transkription/Translation das Firefly Enzym gewonnen werden kann (Abb. aus: TnT Quick Coupled Transcription/Translation System, Promega).

2.10 Größenstandards

Als Größenstandard wurde der SmartLadder von Eurogentec verwendet. Dieser Marker besteht aus 14 verschiedenen Banden von 200bp bis 10.000bp. Jede Bande ist dabei ein Vielfaches von 100. Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, sind die Banden in unterschiedlichen Mengen von 15ng bis 100ng vorhanden.

2.11 Medien/Lösungen

Denaturierender Gelladepuffer (Ambion)	95 % Formamid, 0,5 mM EDTA, 0,025 % xylene cyanol, 0,025 % Bromophenol blau, 0,025 % SDS
5x LB Medium für die Bakterienkultur	Zur Herstellung von 5fach LB-Flüssigmedium wurden 100 g LB Broth Base pro Liter dH ₂ O eingewogen und autoklaviert. Vor Gebrauch wurden dann 100 ml 5fach LB-Medium mit autoklaviertem dH ₂ O auf 500 ml aufgefüllt und je nach Bedarf das gewünschte Antibiotikum zugesetzt. Das 1fach Medium mit Antibiotika-Zusatz konnte bis zu 4 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.
LB-Agar-Platten für die Bakterienkultur	Zur Herstellung von LB-Agar wurden 32 g LB-Agar pro Liter dH ₂ O eingewogen und autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50 °C wurde der Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (Ampicilin 100 mg/L, Tetracyclin 20 mg/L) und auf 10 cm Petrischalen verteilt (ca. 15 ml/Schale). Nachdem der Agar gelatinisiert war, konnten die Platten für mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.
PBS-Puffer	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBST-Puffer	PBS-Puffer mit entsprechender Menge an Tween20 [%]
10x TBE	0,89M Tris, 0,89M Borsäure, 20mM EDTA
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, pH 7,8; 5 mM EDTA
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1 % [w/v] SDS
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat (DEPC) wird zu destilliertem Wasser zu einer Endkonzentration von 0,05 % gegeben. Das Wasser wird für mehrere Stunden mit einem Magnetrührer gerührt und anschließend autoklaviert.
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,1 mM EDTA
Jod Buffer	10 mM Tris-HCl (ph 8), 1 mM EDTA, 4 M NaI

PEG/NaCl	20 % (w/v) polythylene glycol-8000, 2,5 M NaCl – anschließend Autoklavieren
P1-Puffer (Suspensionspuffer)	50 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
P2-Puffer (Denaturierungspuffer)	200 mM NaOH, 1 % SDS
P3-Puffer (Neutralisierungspuffer)	3 M KAc pH 5,5

2.12 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.12.1 Hybridisieren von DNA-Oligonukleotiden

Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit nukleasefreiem Wasser zu einer Endkonzentration von 1 µg/µl gelöst. Zur Hybridisierung wurden je 8 µg der beiden komplementären Oligonukleotide in einem 20 µl-Reaktionsansatz mit 2 µl 10 x Annealing-Puffer (0,5 M NaCl; 0,2 M Tris, pH 7,4) und 2 µl nukleasefreiem Wasser gemischt und in einem mit Wasser gefüllten Becherglas 10 min bei 85 °C erhitzt. Die Hybridisierung erfolgte während des Abkühlens des Reaktionsansatzes von 85 °C auf Raumtemperatur.

2.12.2 In-vitro-Transkription

RNA, welche für das Phage-Display, den FCS- und CD-Messungen sowie für die In-vitro-Translations-Experimente benötigt wurden, wurden durch In-vitro-Transkription von annealten Oligonukleotiden gewonnen. Bei diesen annealten Oligonukleotiden war der Bereich des T7-Promotors (AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GG) doppelsträngig. GMPS konnte zur spezifischen Markierung am 5'-Ende der RNA verwendet werden. Für die Transkription wurde das RiboMAX™ System vom Promega verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus: 20 µl T7-Transkriptionspuffer (5X 400 mM HEPES-KOH pH 7,5, 120 mM MgCl₂, 10 mM Spermidin, 200 mM DTT), 30 µl rNTPs 25 mM, Template Konzentration von 200 nM aufgefüllt auf 40 µl nukleasefreiem Wasser und 10 µl Enzym Mix (T7). Die Reaktion lief dann für vier Stunden bei 37 °C ab.

2.12.3 DNase Verdau

Das DNA-Template wurde nach der In-vitro-Transkription mit RQ I RNasefreier DNase von Promega verdaut. Hierzu wurden zum fertigen Transkriptionsansatz 1 U/ μ g Template DNase RQ I gegeben. Die Reaktion lief für 30 Minuten bei 37 °C ab. Anschließend wurde die DNase durch Phenol-Chloroform-Extraktion (PC-Extraktion) denaturiert und entfernt.

2.12.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA und RNA

Zur Reinigung der Nukleinsäuren nach der In-vitro-Transkription oder anderen enzymatischen Behandlungen, wurden die Nukleinsäuren mit Hilfe der Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt. Der Ansatz wurde auf ein Volumen von 100 μ l mit DEPC-Wasser aufgefüllt, mit dem gleichen Volumen eines TE-gesättigten Phenol/Chloroform/-Isoamylalkohol-Gemisches (25/24/1) pH 7,5-8 versetzt, gevortext und zur Trennung der Phasen zentrifugiert (1 min; 13.000 rpm; RT). Die obere, wäßrige, DNA/RNA enthaltende Phase wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. In der Interphase sind die denaturierten Proteine enthalten. Im nächsten Schritt wurde der in der abgenommenen oberen Phase verbliebene Phenolanteil extrahiert, indem das gleiche Volumen Chloroform hinzugegeben, gevortext und zur Phasentrennung wieder zentrifugiert wurde. Die obere, wäßrige Phase wurde erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und auf die folgende Weise gefällt: DNA Proben wurden gewöhnlich mit 3 Volumen 100 % Ethanol und 1 μ l Glycogen gemischt, während RNA-Proben mit 0,7 Volumen Isopropanol und 0,1 Volumen 3 M Natrium Acetat pH 5,2 gemischt wurden. Durch die Verwendung von Isopropanol wurden die bei einer In-vitro-Transkription im Überschuß verwendeten rNTPs schlechter gefällt, als mit Ethanol. Standardmäßig wurden die Proben dann bei -80 °C für eine Stunde gefällt und 30 Minuten in der Zentrifuge (30 Minuten 14.000rpm 4°C) pelletiert. Das Sediment wurde dann zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in der Speedvac getrocknet und in einem geeigneten Volumen an Puffer oder DEPC-Wasser aufgenommen.

2.12.5 GMPS-Reaktion zur kovalenten Markierung von RNA

Transkripte, die an Stelle der 5'-OH-Gruppe eine SH-Gruppe tragen, können mit Jodacetamiden reagieren. Mit Hilfe dieser Reaktion lassen sich Farbstoff- oder Biotin-markierte Proben herstellen.

Zu diesem Zweck wurde GMPS als Primer für die Kettenverlängerung der T7-RNA-Polymerase verwendet. Dadurch erhält man RNA, welche am 5'-Ende eine SH-Gruppe enthält. Man muß nun während der Reaktion dafür sorgen, daß am Anfang der In-vitro-Transkription hauptsächlich GMPS als erstes Nukleotid verwendet wird. Dies erreicht man, indem anfangs ein Überschuß an GMPS vorhanden ist, der nach und nach durch Zugabe von rGTP aufgehoben wird. Dieses rGTP benötigt man wiederum für eine erfolgreiche Kettenverlängerung, da GMPS kein Substrat für die T7-RNA-Polymerase ist, sondern nur zum Priming verwendet wird.

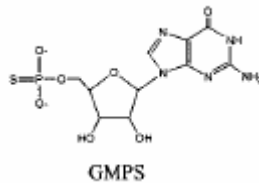


Abb. 2-3 Durch das verwendete GMPS konnte die Transkription begonnen werden. Da es kein Substrat für die T7-RNA Polymerase darstellt, kann es nicht in eine naszierende RNA eingebaut werden.

Der Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus:

Substanz	Menge
Wasser (Nuklease frei)	4 µl
10xIVT Puffer	2 µl
rATP, rUTP, rCTP 75mM	2 µl je
0,2 mM rGTP	1 µl
DNA-Template 1µg/µl	4 µl
GMPS 25 mM	1 µl
T7 RNA Polymerase 400U	2 µl
RNase Inhibitor	1µl

Tab 2-4. Der Reaktionsansatz für eine Markierung der RNA durch GMPS am 5'-Ende ist hier aufgelistet. Es ist darauf zu achten, daß am Anfang der Reaktion die GMPS-Konzentration über der des rGTP liegt. Dadurch wird gewährleistet, daß GMPS hauptsächlich als erstes Nukleotid verwendet wird. Im Lauf der Reaktion wird die Konzentration an rGTP erhöht, so daß die RNA erfolgreich transkribiert wird.

Die Reaktion lief insgesamt zwei Stunden bei 37 °C ab. Alle 20 Minuten wurde 1 µl 20 mM rGTP zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben. Anschließend wurde das DNA-Template durch DNase I verdaut und die RNA durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert und durch Ethanolfällung gefällt. Das entstehende Pellet wurde in 20 mM Natrium-dihydrogenphosphat pH 8 resuspendiert.

Durch den Einbau am GMPS am 5'-Ende der RNA, erhält diese eine Thiolgruppe am 5'-Ende. Diese Gruppe kann mit Iodacetamid eine Alkylierungsreaktion eingehen. Der dabei entstehende Thioether ist stabil.

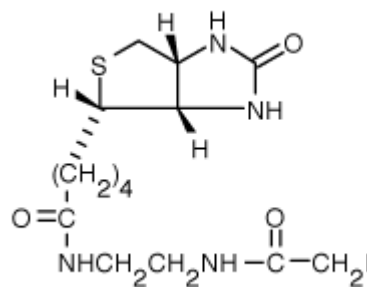


Abb. 2-4. Das verwendete Biotin-Iodacetamid kann GMPS alkylieren und wurde dazu verwendet, um an das 5'-Ende der transkribierten RNA ein Biotin zu binden.

Die Reaktion fand mit der GMPS geprimten RNA und einem Überschuß von Biotin-Iodacetamid für 2h bei Raumtemperatur in wäßrigem Puffer (pH 8) statt. Anschließend wurde die RNA über PAGE gereinigt.

2.12.6 Gelelution von transkribierter RNA aus denaturierenden Poly-Acrylamid-Gelen / UV-Shadowing

Um RNA Transkripte nach der GMPS-Reaktion oder einer In-vitro-Transkription zu reinigen, wurde die RNA durch denaturierende Harnstoff-Gele aufgetrennt und anschließend aus diesen eluiert. Es wurden für RNA Transkripte von einer Länge bis 200 nt durch Harnstoff denaturierende 15 %ige Poly-Acrylamid Gele verwendet. Die RNA wurde durch Zugabe von denaturierendem Auftragspuffer (1:1) und erhitzen auf 95 °C sowie anschließendem abkühlen auf 0 °C denaturiert. Die Proben wurden dann auf das Gel aufgetragen und bei 220 V laufen gelassen. Die RNA wurde im PAA-Gel durch UV-Shadowing sichtbar gemacht.

Beim UV-Shadowing verwendet man eine Kieselgelplatte mit einem Fluoreszenzindikator, wie sie z.B. für Dünnschichtchromatographie verwendet wird. Das Gel wird auf die Platte gelegt und mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm wird die Nukleinsäure sichtbar gemacht. Sie erscheint als dunkle Stelle auf dem Gel. Die entsprechende Bande wird ausgeschnitten

und mechanisch zerkleinert. Die eigentliche diffusionskontrollierte Elution findet über Nacht bei 4 °C unter Rühren mit einem großen Überschuß an Elutionspuffer im Vergleich zum Gelvolumen statt. Das Gelstück wurde entsprechend in 5ml Elutionspuffer (RNase-Inhibitor, DEPC-TE-Puffer) in 15 ml Falcon-Röhrchen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gelstücke durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand mit der eluierten RNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7 Volumen Isopropanol und 0,1 Volumen NaAc gefällt.

2.12.7 Gelretardationsexperimente mit biotinylierter RNA

Um zu überprüfen, ob die RNA über das GMPS mit dem Biotin markiert wurde oder um zu erkennen, ob die Hybrid RNA mit dem Biotin- und Fluorescein-Oligonukleotid annealt wurde, wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden die jeweiligen RNAs mit einem Überschuß an Streptavidin inkubiert und anschließend auf ein 3% natives Agarosegel aufgetragen. Streptavidin erhöht die Masse des RNA-Komplexes und führt dadurch zu einer langsameren Wanderung in dem Gel als bei der RNA ohne Streptavidin. Die RNA wurde im Falle der GMPS-RNA mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und im Falle des RNA-Hybrides wurde zunächst auf eine Färbung mit Ethidiumbromid verzichtet. Dadurch konnte man im UV-Licht die geschiftete Nukleinsäure anhand der Fluorescein-Fluoreszenz erkennen, was auf das Vorhandensein des gewünschten Komplexes hindeutet. Anschließend wurde auch hier die RNA durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.

2.12.8 Gekoppelte In-vitro-Translation und -Transkription: das TnT Quick Coupled Transcription/Translation System

Um zu überprüfen, ob die gefundenen Peptide einen Einfluß auf die Expression von Reportermolekülen haben, wurde das TnT Quick Coupled Transkription/Translation System von Promega verwendet. Der Reaktions-Mastermix enthält neben dem Reticulozytenextrakt (gewonnen aus Kaninchen), der für die Translation zuständig ist, auch T7-RNA Polymerase für die Transkription der RNA sowie Nukleotide, RNase Inhibitoren und freie Ionen.

Für eine Reaktion wurden 1 µg pRL-TK Plasmid, 1 µg Luziferase-Kontroll Plasmid, 40 µl TnT Quick Master Mix, 1 µl 1mM Methionin, aufgefüllt auf 50 µl Wasser verwendet. Zusätzlich dazu wurden die gefundenen Peptide mit der Endkonzentration von 1 mM zu den Reaktionszeiten Start (0 Minuten), 30 Minuten und 60 Minuten hinzugegeben. Die gesamte

Reaktion lief für 90 Minuten bei 30 °C. Anschließend wurde die Aktivität der unterschiedlichen Luziferasen durch den Dual-Luziferase-Assay ermittelt.

Das hier verwendete pRL-TK Plasmid ist das Reporterplasmid. Hier wurde die b2a2-Wildtypsequenz bzw. die b2a2-Sequenz der Mutante 5 zwischen dem T7-Transkriptionsstart und dem Translationsbeginn der Renilla Luziferase kloniert. Als interne Kontrolle diente das Luziferase-Kontroll-Plasmid welche das Gen für die Firefly Luziferase enthält.

2.12.9 Sekundärstrukturanalyse der b2a2 mRNA durch MFold

Durch das Programm MFold ist es möglich, Strukturvorhersagen einer mRNA-Sequenz zu tätigen. Um mRNA Bereiche zu ermitteln, welche die Möglichkeit besitzen sich in Strukturen zu falten, wurde das Programm MFold V3.1 von Zuker verwendet (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/form1.cgi>). Die Strukturvorhersage wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt: folding temperatur (fix) 37 °C, Ionic conditions (fix) 1 M NaCl, percent suboptimality number 5, upper bound on the number of computed foldings 50, windows parameters default, maximum interior/bulge loop size 30, maximum asymmetry of an interior/bulge loop 39, maximumdistance between paired bases no limit.

Die Höchstgrenze für die Zahl der zu faltenden Nukleotide betrug 3.000 nt. Aus diesem Grund mußte die bcr-abl mRNA in mehrere Fragmente geteilt werden, die unabhängig voneinander gefaltet wurden. Als Resultat erhielt man ein Energiediagramm, aus welchem die Stärke und der Ort der Nukleotid-Nukleotid Interaktion ersichtlich ist und ein Diagramm, bei welchem alle Strukturvorschläge der jeweiligen RNA-Abschnitte übereinandergelegt werden können. Beide Diagramme wurden herangezogen, um Sequenzabschnitte zu definieren, die die Möglichkeit einer Faltung besitzen. Aus diesen Ergebnissen wurden die minimal zur Strukturbildung notwendigen Sequenzen ermittelt und die synthetisierten ODNs für eine In- vitro-Transkription verwendet.

Schließlich diente MFold auch dazu die Strukturen der bei der CD-Titration verwendeten Mutanten zu überprüfen.

2.12.10 Strukturmapping der RNA

Sekundärstrukturen innerhalb der bcr-abl mRNA können mit Hilfe von Algorithmen vorhergesagt werden. Um diese berechneten Daten mit den experimentellen Daten zu unterstützen, sollte ein RNA Strukturmapping durchgeführt werden.

Dazu bedient man sich unterschiedlicher Klassen an RNasen: ds- sensitive und ssRNA sensitive RNasen. Diese Enzyme haben jedoch aufgrund ihrer Größe den Nachteil, bei kurzen RNAs nur recht ungenaue Strukturangaben zu liefern. Detailliertere Aussagen über RNA sekundär Strukturelemente lassen sich durch Verwendung künstlicher Nukleasen erhalten. Beide Methoden wurden für die RNA eingesetzt.

2.12.11 RNase Inkubation und Reverse-Transkriptase Reaktion

Für das Strukturmapping wurden die folgenden unterschiedlichen Ribonukleasen verwendet: Ribonuklease T1 und V1 von Ambion sowie Ribonuklease T2 von Sigma. Tab. 2-5 gibt einen Überblick über die Spaltungsspezifität der jeweiligen RNasen.

Nuklease	Spaltet
RNase T1	3' von ssG's
RNase V1	dsRNA
RNase T2	ssRNA

Tab. 2-5. Mit den verwendeten RNasen ist eine grobe Kartierung der RNA Struktur in einzelsträngige und doppelsträngige Bereiche möglich. Sie wurden herangezogen, um die von MFold vorgesagte Struktur im Experiment zu verifizieren.

Mit Hilfe dieser RNasen lassen sich einzelsträngige und doppelsträngige RNA-Bereiche identifizieren.

Zunächst wurde die b2a2-RNA (RNA Nummer 10) durch In-vitro-Transkription synthetisiert, DNase I verdaut und durch PAGE gereinigt. Pro Ansatz wurden 30 ng RNA b2a2 (RC10), 120 ng tRNA, 2 µl 10x Strukturfuffer (10x: 100 mM Tris pH 7, 1 M KCl, 100 mM MgCl₂) aufgefüllt auf 19 µl Wasser verwendet. Schließlich wurde noch 1 µl der jeweiligen RNase hinzugegeben. Tab. 2-6 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Ansätze.

Nummer	RNase	U RNase	Inkubationszeit	Sonstiges
1	RNase T1	0,3	15'	
2	RNase T1	0,03	15'	
3	RNase T1	0,003	15'	
4	RNase T1	0,3	30'	
5	RNase T1	0,03	30'	
6	RNase T1	0,003	30'	
7	RNase T2	0,3	15'	
8	RNase T2	0,03	15'	
9	RNase T2	0,003	15'	
10	RNase T2	0,3	30'	
11	RNase T2	0,03	30'	
12	RNase T2	0,003	30'	
13	RNase V1	0,1	15'	
14	RNase V1	0,01	15'	
15	RNase V1	0,001	15'	
16	RNase V1	0,0001	15'	
17	RNase V1	0,00001	15'	
18	RNase V1	0,000001	15'	
19	Ohne RNase	-	-	Kontrolle ohne RNase
20	Alkalische Hydrolyse	-	2'	Basenleiter
21	Alkalische Hydrolyse	-	5'	Basenleiter
22	Alkalische Hydrolyse	-	15'	Basenleiter

Tab. 2-6. Bei den durchgeführten Experimenten wurden zum einen die Konzentrationen der unterschiedlichen RNasen verändert und auch die Inkubationsdauer mit den RNasen. Die durch alkalische Hydrolyse produzierte Basenleiter war später als Marker notwendig, um die Schnittstellenmuster bestimmten Basen zuzuordnen. Nach Inaktivierung der RNasen und Reinigung der RNA wurde eine Reverse-Transkriptase-Reaktion mit einem Cy5-markierten Primer durchgeführt, um Cy5 markierte cDNA zu erhalten.

Die alkalische Hydrolyse ist notwendig, um eine Basenleiter zu bilden, mit welcher es möglich ist, die einzelnen Peaks der RNasen einer bestimmten Base zuzuordnen. Sie wurde auf die folgende Weise generiert: 30 ng RC10 RNA, 120 ng tRNA wurden aufgefüllt auf 15 µl alkalischer Hydrolyse Puffer (50 mM Natriumcarbonat, pH 9,2, 1 mM EDTA). Die 15 µl wurden auf 3 Reaktionsgefäße verteilt und unterschiedliche lange bei 95 °C inkubiert dann ebenso behandelt, wie die RNase-Ansätze.

Zu allen den Proben wurde nach dem Verdau jeweils 20 µl Inactivation Puffer (Ambion) gegeben und die RNA bei -20 °C durch Ethanol gefällt, pelletiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde mit den Proben eine Reverse-Transkriptase Reaktion durchgeführt.

Um die geringen Mengen der partiell verdauten RNA detektieren zu können, war es notwendig die RNA in cDNA umzuschreiben, wobei ein Cy5-Markierter Primer verwendet wurde. Das Chromophor konnte dann durch Gellauf im ALFexpress mit Hilfe eines Lasers detektiert werden. Das bei der RT-Reaktion verwendete Enzym SuperScript II von Invitrogen ist eine reverse-Transkriptase, abgeleitet von der M-MuLV RT, mit stark verringerter RNase H Aktivität. Dieses Enzym katalysiert die Einzelstrang cDNA-Synthese mit einer RNA als Template. Für eine Reaktion wurde 4 µl 50 mM MgCl₂, 2 µl First Strand Synthesis Puffer (5x: 250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl 5 mM dNTPs, 3 µl 30 ng Cy5-Primer, 0,5 µl RNasin und 7,5 µl RNA vom RNase-Mapping (30 ng). Dieses Gemisch wurde nun entsprechend Tabelle 2-7 inkubiert. Zu Beginn des 42 °C-Inkubationsschrittes wurde 1 µl (200U) Super-ScriptII hinzugegeben.

Zeit	Temperatur
5'	80 °C
75'	42 °C
2'	99 °C
	4 °C

Tab. 2-7. Die Reverse-Transkriptase Reaktion lief für 75 Minuten bei 42 °C ab. Während dieser Reaktion wurde aus den partiell verdauten RNA-Fragmenten des RNase-Mappings eine Cy5 markierte cDNA gewonnen.

Als Resultat erhält man unterschiedlich lange Cy5-cDNA-Fragmente, aus deren Längen man auf die Spaltstelle der RNasen zurückschließen kann. Anschließend erfolgte die Auftrennung durch ein denaturierendes (Harnstoff) PAA-Gel.

2.12.12 Hydrolytische Spaltung der RC10 RNA mit einer künstlichen Nuklease

Das nachfolgend beschriebene Experiment wurde von Dr. Scheffer in der AG Prof. Göbel durchgeführt.

Sekundär Struktur-Informationen konnten mit Hilfe einer künstlichen Nuklease, die spezifisch ssRNA hydrolysiert, erhalten werden. Bei der in diesem Experiment eingesetzten künstlichen Nuklease handelt es sich um ein Acylguanidin-Derivat. Um alle RNA-Spaltprodukte analytisch zu erfassen, wurde das folgende RC10 RNA Konstrukt angefertigt: ein DNA Spacer von 10nt (dT) wurde zwischen dem Cy5 und 5'-RNA-Ende eingefügt. An das 3'-Ende wurden weitere 4nt (dT) angehängt. Die 5'-Modifikation erleichtert die Analyse aller Spaltprodukte, die 3'-Modifikation führt zu einer klaren Trennung von Edukt- und Produktpeaks.

Die Spaltreaktion wurde Angesetzt mit 150nM RNA und 1mM Acylguanidin in Puffer X1 (50 mM Tris-HCl pH 6, 0,01 % SDS). Das Gesamtvolumen betrug 10µl. Die Reaktion lief dann für 20 Stunden bei 37 °C ab.

Mit dem ALFexpress, einem automatischen DNA Sequenzer, werden Cy5-Markierte Nukleinsäuren detektiert. Während der Gelelektrophorese durch ein denaturierendes Gel werden 40 Spuren simultan mit einem Laser der Wellenlänge 633 nm bestrahlt. Die Anregungswellenlänge von Cy5 liegt bei 643 nm und emittiert Licht der Wellenlänge 667 nm. Das emittierte Licht wird von einem linearen Array von Photodioden detektiert. Die Daten werden dann mit dem Programmpaket AlleleLinks™ ausgewertet. Ein normaler Gellauf findet mit einem denaturierenden PAA Gel statt, welches auf 55 °C temperiert wird. (16% 8M Harnstoff PAA-Gel, Laufpuffer 0,5xTBE, Ladepuffer:5mg/ml Dextran Blau in Formamid)

2.12.13 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Bei den für den Verdau von Plasmid-DNA verwendeten Enzymen handelte es sich um Restriktionsendonukleasen vom Typ II. Dieser Typ spaltet innerhalb der spezifischen Erkennungssequenz die Phosphodiester-Bindungen im doppelsträngigen DNA-Molekül. Dabei entstehen je nach gewähltem Enzym entweder glatte Enden oder unterschiedlich lange 5'- oder 3'-überhängende Enden. Für einen Restriktionsansatz zu analytischen Zwecken, um z. B. positive Minipräparationen zu erkennen, wurden 0,5 µg – 1 µg Plasmid-DNA mit etwa 5fachem Enzymüberschuß (5 U Enzym/µg Plasmid-DNA) in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer bei der empfohlenen Reaktionstemperatur in 1–2 stündiger Inkubation verdaut. Zur Kontrolle des Verdaus wurden die Restriktionsansätze auf

ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen aufgetragen und die DNA im elektrischen Feld nach ihrer Länge aufgetrennt. Für einen präparativen Restriktionsansatz wurde die eingesetzte Plasmid-DNA Menge auf bis zu 20 µg erhöht.

2.12.14 Kinasieren und Dephosphorylieren von Nukleinsäuren

Das Enzym T4 Polynukleotid Kinase katalysiert den Phosphatgruppentransfer vom γ P1-ATP zu dem 5' hydroxyterminus von Polynukleotiden. Dadurch erhalten die synthetisierten Oligonukleotide am 5'-terminus eine freie Phosphatgruppe, welche für die Ligationsreaktion notwendig ist. Die Reaktion wurde in T4 DNA Ligase Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, pH 7,5) durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden mit 10 U Enzym/ 300 pmol freie 5'-Enden für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend für 20 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert. Im Anschluß konnten die phosphorylierten Oligonukleotide ohne weitere Reinigung ligiert werden.

Zum entfernen von 5' Phosphat bei dNTPs und rNTPs wurde das Enzym alkalische Phosphatase entfernt verwendet. Dadurch wird die Rezirkulation eines geschnittenen Vektors während der Ligation verhindert. Das Enzym funktioniert in allen verwendeten Restriktionsendonuklease-Puffern, so daß im Anschluß an eine Restriktion 1 µl des CIP-Enzym hinzugefügt (0,5 U/µg Vektor) und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurde.

Da das Enzym fest an der Plasmid-DNA bindet und somit die Ligation stören kann, wurde anschließend eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Entfernung des Enzyms durchgeführt.

2.12.15 Ligation von Vektoren mit Inserts und Transformation

Das Quick Ligations-Kit von NEB wurde für die Ligation verwendet. Ziel einer Ligation ist es, zwei DNA-Enden miteinander zu verbinden, wobei kovalente Verbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe gebildet werden. Ein Ligationsansatz setzte sich aus 50 ng von dephosphoryliertem Vektor und einem 3 fachen molaren Überschuß von kinasierten Oligonukleotiden bzw. dem Insert zusammen. Dieses Volumen wurde auf 10µl Wasser aufgefüllt und 10 µl Quick-Ligations-Puffer (2x Puffer: 132 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 2 mM ATP 15 % PEG 6000, pH 7,6) hinzugefügt. Dann wurde 1 µl Quick T4 DNA Ligase hinzugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis gebracht und transformiert. Um die Effizienz des Ligationsansatzes und des Verdaus sowie das Dephosphorylieren zu

kontrollieren, wurde immer eine Ligationskontrolle ohne Insert verwendet, welche ebenfalls transformiert und ausplattiert wurde.

Unter Transformation versteht man das Einschleusen von DNA in kompetente Bakterien. 50 µl tiefgefrorene (-80 °C) kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Die entsprechende DNA-Menge (z. B. 10 % vom Ligationsansatz) wurde vorsichtig mit den Zellen gemischt und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch einen kurzen Hitzeschock von 37 °C für 30 Sekunden wurden die Bakterien für die DNA-Aufnahme permeabel gemacht. Anschließend wurden sie nochmals für 2 Minuten in Eis inkubiert. Dann wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und die Bakterien wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit sollen die Bakterien die Möglichkeit erhalten etwaige Resistenzgene zu aktivieren. Sie wurden anschließend auf LB-Agar Platten (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Für die Klonierungen hatten die hier verwendeten Plasmide eine kodierende Sequenz für das Ampicillin-Resistenz-Gen, so daß eine Selektion der positiven Transformanten möglich war. Ein Tetrazyklin-Resistenz-Gen trugen die Minitransposons, welche bei dem Phage Display verwendet wurden. Nach 16 Stunden wurden die Kolonien zur Expansion von der Platte gepickt und in 3 ml LB-Flüssigmedium (mit dem entsprechenden Antibiotikum) unter Schütteln (37 °C, 175 rpm) über Nacht kultiviert.

2.12.16 Plasmid Minipräparation durch alkalische Lyse

Diese Methode wurde zur Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA (5 µg– 10 µg) aus einer 3 ml Übernachtskultur durchgeführt. Je 2 ml Übernachtskultur wurden in Reaktionsgefäße für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Bakterienzellen wurden in 300 µl Puffer1 (10 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; RNase A) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 2 (200 mM NaOH; 1 % [w/v] SDS) wurden die Zellen durch vorsichtiges Invertieren lysiert und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Puffer 3 (300 µl 3 M KAc, pH 4,8) wurde zur Neutralisierung der Proben zugefügt, gut gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15minütige Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rpm, um die ausgefallenen Proteine, Membranbestandteile und chromosomale DNA zu pelletieren. Die niedermolekulare Plasmid-DNA im Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und durch Zugabe von 3 Vol 100 % Ethanol und 1 µl Glycogen gefällt. Die Proben wurden dann für 20 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, um die gefällte Plasmid-DNA zu pelletieren. Nach zweimaligem waschen der Plasmid-DNA mit 70 % Ethanol und trocknen in der Speedvac, wurde die

Plasmid-DNA in 25 µl TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA) oder nukleasefreiem Wasser resuspendiert.

2.12.17 Plasmid Maxipräparation mit JETster Genomed Säulen

200 ml LB Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum wurde mit 3 ml Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 175 rpm inkubiert. Die Bakterienzellen wurden dann durch Zentrifugation (5.000 rpm; 4 °C; 10 min, JA20-Rotor, Beckmann Zentrifuge) pelletiert und in 10 ml Puffer 1 (50 mM Tris; 10 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 mg/ml RNase) resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH; 1 % SDS) und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 10 ml Puffer 3 (3,1 M Kalzium Acetat; pH 5,5) neutralisiert und 10 min auf Eis inkubiert, dann zentrifugiert (15.000 rpm; 18 °C; JA10, Beckmann Zentrifuge), um die gefällten Proteine, Membranbestandteile und genomische DNA zu entfernen. Parallel dazu wurde die Genomed-Säule, welche ein Anionen-Austauscher ist, mit 30 ml Puffer 4 (600 mM NaCl; 100 mM Natrium Azetat; 0,15% Triton X-100, pH 5) äquilibriert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit dem Plasmid auf die äquilibrierten Säulen gegeben und einmal mit 60 ml Puffer 5 (800 mM NaCl; 100 mM Natrium Azetat; pH 5) gewaschen. Durch Zugabe von 15 ml Puffer 6 (1,25 M NaCl; 100 mM Tris/HCl, pH 8,5) wurde die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA eluiert. Mit 0,7 Volumen 100 % Isopropanol wurde die eluierte Plasmid-DNA gefällt, 40 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und anschließend noch zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen (4.000 rpm, 10 min). Nachdem die Plasmid-DNA in der Speedvac getrocknet war, wurde sie in 200 µl dH₂O gelöst. Die Plasmid-DNA Mengenbestimmung erfolgte an einem UV-Spektralphotometer mit einer Wellenlänge von 260 nm in Quartzküvetten.

2.13 Arbeiten mit Proteinen

2.13.1 TnT Quick Coupled Transkription/Translation System: der Einfluß der Peptide auf die Expression

Um zu überprüfen, ob die Peptide einen Effekt auf die Expression von Reportermolekülen besitzen, die hinter der b2a2 RNA Struktur exprimiert werden, wurde ein zellfreies Testsystem etabliert. Ausgehend von verschiedenen Plasmiden, welche entweder die Firefly

Luziferase als interne Kontrolle oder die Renilla Luziferase als Reporter exprimieren, wurde die Aktivität der Peptide auf die Expression ermittelt. Vor die Renilla Luziferase wurde an die *NheI*-Schnittstelle entweder die B2A2-Wildtypsequenz (entspricht dem Target Nummer RC10) oder die B2A2 Mutante 5 kloniert. Das System besteht aus dem TnT QuickMasterMix. In diesem Mix ist zum einen TnT Rabbit Reticulozyten Lysat, welches die Translation ermöglicht, und zum anderen die TnT T7 RNA Polymerase. Dieses Enzym katalysiert die Transkription vom T7-Promotor ausgehend. Zusätzlich dazu waren noch Puffer, RNase Inhibitor und Aminosäuren vorhanden.

Für eine Standard-Reaktion wurde nun 40 µl TnT Quick-Master-Mix vorgelegt; Dann wurde 1 µg Kontrollplasmid (Firefly) und 1 µg Reporterplasmid (Renilla) mit der b2a2 wt oder M5 Sequenz hinzugegeben. Die Reaktion selbst lief für 90 Minuten bei 30 °C ab. Um die Eigenschaften der Peptide auf die Expression zu testen, wurde jeweils zu den Zeiten 0', 30' und 60' 1 mM Peptid-Endkonzentration hinzugegeben (1-2 µl je nach Peptid).

Die Aktivitäten der unterschiedlichen Luziferasen wurden anschließend mit dem Dual-Luziferase-Assay ermittelt.

2.13.2 Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated: Der Einfluß der Peptide auf die Translation

Um zu unterscheiden, ob die Peptide einen Effekt auf die Transkription oder auf die Translation besitzen, wurden diese beiden Reaktionen voneinander getrennt. Zunächst wurde ohne Peptid die Transkription mit dem T7-RiboMax Express-System durchgeführt, die RNA gereinigt, quantifiziert und dann anschließend die Translation mit dem Rabbit Reticulocyte Lysate System durchgeführt. Auch hier wurden die Aktivitäten der unterschiedlichen Luziferasen mit dem Dual-Luziferase-Assay ermittelt.

Für einen Ansatz wurde zunächst durch In-vitro-Transkription die RNA generiert. Hierzu wurde 1 µg Plasmid-Template mit 7 µl nukleasefreiem Wasser aufgefüllt, 10 µl 2x Reaktionspuffer und 2 µl T7-Enzym hinzugegeben. Die Reaktion lief dann für zwei Stunden bei 30 °C ab. Durch anschließendes Hinzugeben von 2 µl RNase-freier DNase RQ I wurde das Template entfernt und die Polymerase durch PCI-Extraktion inaktiviert und entfernt. Der Translationsansatz wurde um den Faktor 5 heruntergescalt, so daß ein Ansatz folgendermaßen aussah: 7 µl Nuclease treated Rabbit Reticulocyte Lysat, 0,1 µl Aminosäuren ohne Leucin 1 mM, 0,1 µl Aminosäuren ohne Methionin 1 mM, 0,2 µl RNase Inhibitor, 2x 0,4 µl RNA von der In-vitro-Transkription (Siehe auch Tab. 2-8) aufgefüllt auf 10 µl Wasser. Die

Reaktion lief für 90 Minuten bei 30 °C statt und zu den Zeiten 0, 30 und 60 Minuten wurden 1 mM Peptid 14 hinzugegeben.

Ansatz	1		2		3		4	
Luziferase	Firefly	Renilla	Firefly	Renilla	Firefly	Renilla	Firefly	Renilla
Art	wt	B2a2 Mutante 5	wt	B2a2	wt	B2a2 Mutante 5	wt	B2a2
Peptid 14	Nein		Nein		Ja		Ja	

Tab. 2-8. Diese vier Ansätze wurden bei der In-vitro-Translation berücksichtigt. Sie sollen Auskunft darüber geben, ob das Peptid 14 die Translation beeinflussen kann. Anschließend wurden die Aktivitäten der unterschiedlichen Renillen photometrisch ermittelt und ausgewertet.

Durch die Trennung der Transkription und Translation soll untersucht werden, ob das Peptid 14, welches nur bei der Translation vorhanden ist, einen Effekt auf die Transkription oder auf die Translation besitzt.

2.13.3 Dual Luziferase Assay zum Aktivitätsnachweis der Luziferasen

Mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System wurde die Aktivität der unterschiedlichen Luziferasen ermittelt. Die Aktivität ist direkt proportional zur Menge der Luziferase, so daß eine hohe Aktivität gleichbedeutend mit einer größeren Menge an Luziferase ist. Durch das Reticulozyten-Lysat-Experiment exprimiert man in einem Reaktionsgefäß zwei unterschiedliche Luziferasen. Zum einen die Renilla Luziferase, welche als Reporterluziferase dient, und die Firefly Luziferase, welche hier als interne Kontrolle fungiert. Mit dem DLA-System ist es nun möglich, die Aktivität beider Luziferasen getrennt voneinander zu bestimmen. Zunächst wurde zu 4 µl Lysat 100 µl LARII Substrat gegeben. Dieses Substrat ist notwendig um die Aktivität der Firefly Luziferase zu ermitteln. Dieses 61kD monomere Protein katalysiert die Oxidations-Reaktion von Beetle Luciferin zu Oxyluziferin, wobei meßbare Biolumineszenz entsteht. Als Co-Faktoren werden ATP, Magnesium und Sauerstoff benötigt. Durch die Zugabe von CoA wird die Biolumineszenz über mehrere Minuten stabilisiert.

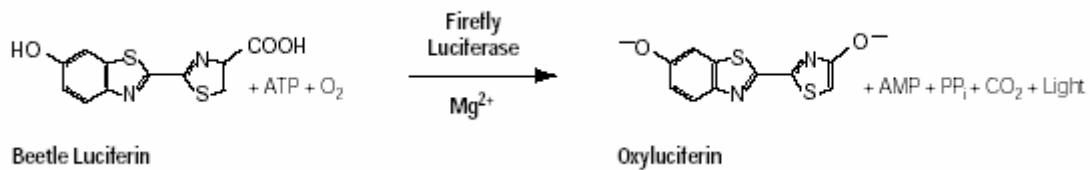


Abb. 2-5. Die Aktivität der Firefly Luziferase wird als erstes durch den Dual-Luziferase-Assay ermittelt. Das 61kD monomere Protein katalysiert die Reaktion von Beetle-Luciferin zu Oxyluciferin, wobei Photolumineszenz gemessen werden kann. Nötig für die Katalyse sind neben Magnesiumionen auch ATP und Sauerstoff. (Abb. aus: Promega Dual-Luciferase Reporter Assay System, Technical Manual No. 040)

Als Ergebnis erhält man eine gleich bleibende Biolumineszenz, die photometrisch ermittelt werden kann.

Durch die Zugabe von 100 µl Stop&Glo® Reagenz wird zum einen die Firefly-Reaktion um den Faktor 10⁵ gequencht und die Renilla-Reaktion wird ermöglicht.

Die Renilla Luziferase ist ein monomeres, 36kD großes Protein, welches in Gegenwart von Sauerstoff Coelenterazin zu Coelenteramid umsetzt und dabei ebenfalls Biolumineszent wird.

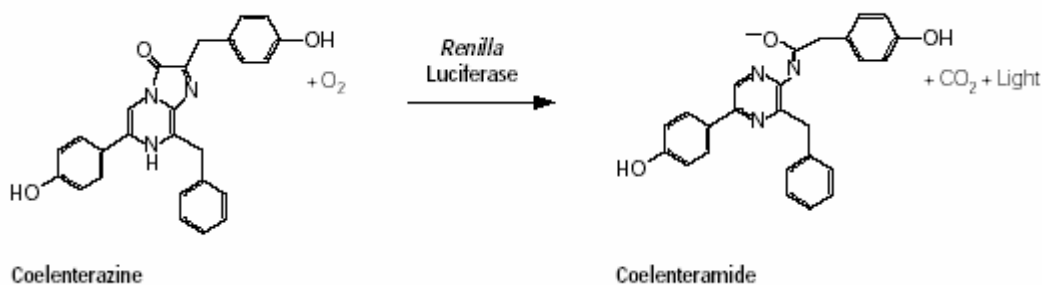


Abb. 2-6. Nachdem die Aktivität der Firefly Luziferase ermittelt wurde, wird die Aktivität der Renilla Luziferase gemessen. Durch Zugabe des Stop&Glow® Reagenz des Dual-Luziferase Assays wird zum einen die Reaktion der Firefly gequencht (Abb. 2-5) und zum anderen werden die Substrate für die Renilla hinzugegeben. Das Protein katalysiert die Reaktion von Coelenterazin zu Coelenteramid, wobei Biolumineszenz detektiert werden kann (Abb. aus: Promega Dual-Luciferase Reporter Assay System, Technical Manual No. 040).

Auch hier beobachtet man eine Biolumineszenz, die mit dem Spektrometer detektierbar ist. Der verwendete Spektrometer war ein Lumistar Galaxy mit der dazugehörigen Software. Für eine Messung wurden die folgenden Parameter gewählt: No. Of intervall 1, Measurement interval time 20 s, Positioning delay 0.1, Gain 200-250, no shaking or injection. Verwendet wurden weiße Costar 96 Platten.

2.14 Arbeiten mit Phagen

2.14.1 Der M13 Phage

Der Bakteriophage M13 ist ein filamentöser Phage, der männliche Bakterienstämme infizieren kann. Das wt-Genom besteht aus einer zirkulären einzelsträngigen DNA mit einer Länge von 6.400 nt. 10 verschiedene Gene (I bis X) werden vom Genom kodiert, wobei an das kleine Oberfläche Protein pIII die Peptidbibliothek fusioniert wurde. Dieses Protein vermittelt die Infektion durch Bindung an den F-Pilus des Bakteriums. Die Phagen Bibliothek wurde aus dem M13mp19 Klonierungsvektor abgeleitet. Dieser Vektor besitzt neben den Phagen Proteinen noch den Lac-Repressor (*lacI*), der die Regulation des *lac* Promotors ermöglicht sowie das *lacZ* Gen, welches die α -Komplementation mit einem Host ermöglicht, der eine proximale Deletion des *lacZ* Genes besitzt.

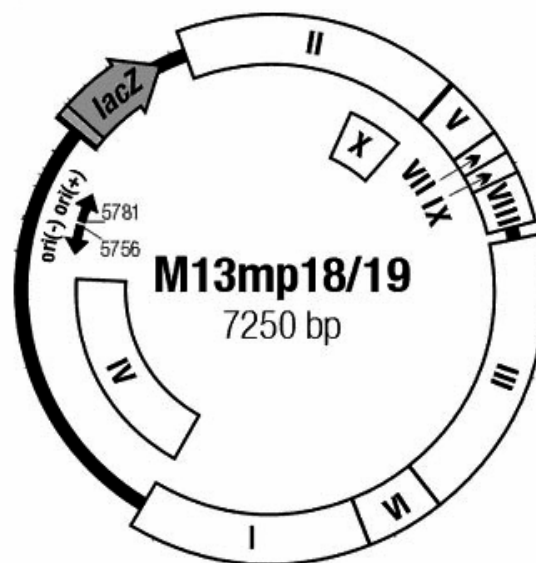


Abb. 2-7. Diese Karte zeigt das M13 Phagengenom. Insgesamt besitzt der Phage 10 Gene, von denen für das Phage Display Gen III eine besondere Bedeutung besitzt. In diesem Gen, welches das kleine Oberflächenprotein kodiert, wird die Peptidbibliothek fusioniert. Auf diese Weise wird die Präsentation des Peptides auf dem Phagenprotein ermöglicht. Das *lacZ*-Gen wird zur Sichtbarmachung von positiven Phagen auf IPTG/X-Gal-Platten in Verbindung mit den ER2738-Bakterien benötigt.

Durch die Verwendung des *lacZ* Genes ist eine Blau-Weiß-Selektion möglich, die es einem erlaubt, wt-Phagen von den Bibliotheken-Phagen zu unterscheiden.

2.14.2 Phage Display zum Finden von Peptidliganden

Phage Display ist eine Selektionsmethode, bei welcher ein Phage ein Peptid an einem Oberflächenprotein trägt. Man bekommt somit eine physische Verbindung zwischen dem präsentierten Peptid und der DNA-Sequenz, die das Peptid kodiert. Dies ermöglicht es mit mehreren Anreicherungsschritten diejenigen Peptide zu finden, die an die Zielstruktur bevorzugt binden können. Bei den hier verwendeten Bibliotheken wurde eine kombinatorische Bibliothek von zufälligen Peptiden mit dem kleinen Hüllprotein (pIII) des M13 Phagen fusioniert. Das exprimierte Peptid befindet sich am N-Terminus des Proteines, welches sich an einem Ende des stäbchenförmigen Phagen befindet und fünf bis achtmal vorkommt. Nach dem exprimierten Peptid folgt eine Linkersequenz (GGGS), dann die wt-Sequenz des pIII. Die Phagen Bibliothek erreicht dadurch eine Diversität von etwa 3×10^9 . Verwendet wurden Bibliotheken mit einem 7mer und 12mer präsentierten Peptid.

Grundlegend besteht eine Phage-Display Selektionsrunde aus den folgenden Schritten: Inkubation der Zielstruktur mit dem Phagen Pool (n), entfernen der unspezifischen Phagen-Binder und Elution der Phagen, die mit der Zielstruktur interagieren, amplifizieren des Phagen Pools und erneute Inkubation der Zielstruktur mit dem Phagen Pool (n+1). Abb. 2-8 zeigt einen positiven Selektionszyklus.

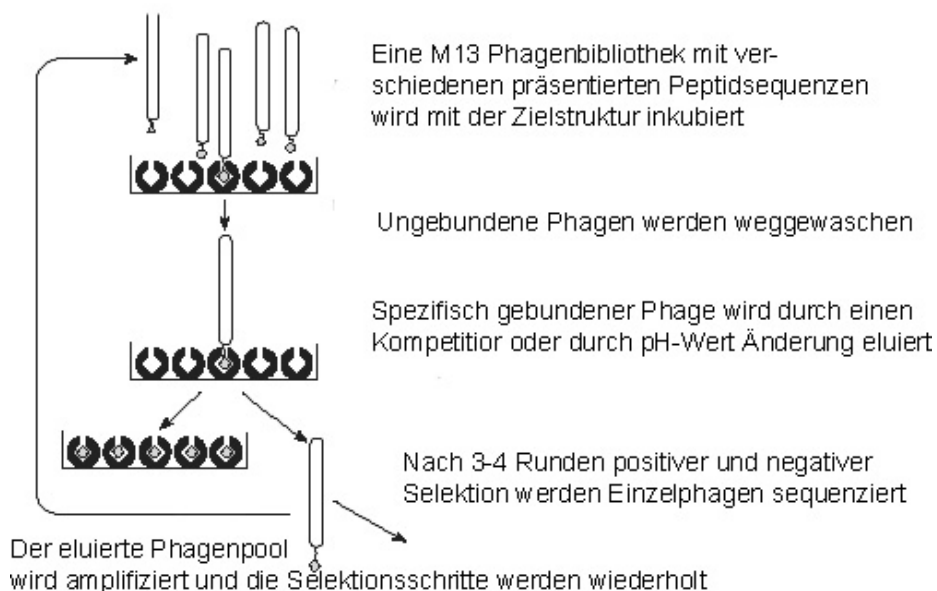


Abb. 2-8. Schematisch ist hier ein Phage Display Selektionszyklus dargestellt. Prinzipiell ist das Ziel eines Selektionszyklusses, daß man Display-Phagen erhält, welche sich spezifischer als andere Display-Phagen an das Ziel binden können. Ein Selektionszyklus setzt sich aus den Schritten: Inkubation (Die Zielstruktur wird der Phagenbibliothek präsentiert und inkubiert), Waschen (Die nicht oder nur schwach gebundenen Phagen werden entfernt) sowie Elution (Die spezifisch gebundenen Phagen werden eluiert). Dieser eluierte Phagen Pool wird anschließend amplifiziert und ein weiterer Selektionszyklus wird durchgeführt. Für eine negative Selektion verwendet man eine nicht-Ziel RNA als Zielstruktur und arbeitet mit denjenigen Phagen weiter, die diese Struktur nicht gebunden haben. (Abb. aus: Ph.D. – 7th Phage Display Peptide Library Kit)

Das Biopanning wurde so durchgeführt, daß die RNA-Zielstruktur während der Inkubation nicht an eine Matrix gebunden ist. Dies hat den Vorteil, daß die RNA für die Phagen besser

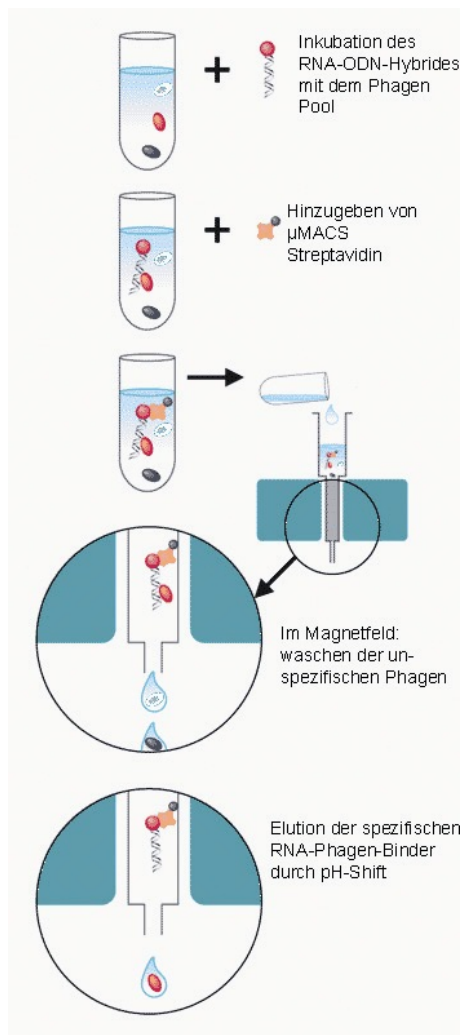


Abb. 2-9. Beschreibt die hier durchgeführte Phage Display Selektionsmethode. Sie ermöglicht eine Interaktion der ungebundenen RNA in der Lösung mit dem Phagen, was der RNA mehr Freiheitsgrade erlaubt, als wenn dies an eine Matrix gebunden wäre.

Der Waschschritt findet auf einer Säule statt, die einen effektiveren Waschschritt im Vergleich zur Bindung an Platten ermöglicht. Ein Selektionszyklus besteht hier auch aus den Schritten Inkubation, Waschen und Elution.

Nach dem Inkubationsschritt wird magnetisches Streptavidin zu dem Gemisch hinzugegeben. Dies ermöglicht im Magnetfeld die Bindung der RNA an die Säule. (Abb. nach: Miltenyi Biotec, µMACS Streptavidin Kit)

zugänglich ist und sich frei in der Lösung bewegen kann. 10 µl der Library, welche etwa 4×10^{10} Phagen enthält, wurden mit 600 ng des RNA-Fluorescein-Biotin Hybrides und 4 µg tRNA als negativ Kompetitor für 2 Stunden bei Raumtemperatur in PBS- 0,05 % Tween 20, 1 mg/ml BSA inkubiert. Mit der Hilfe des µMACS Streptavidin Kit wurde die biotinylierte RNA angereichert. Hierzu wurde zu der RNA nach der Inkubationszeit 100µl µMACS Streptavidin gegeben. Dieses Streptavidin ist an ein magnetisches Partikel gebunden und läßt sich somit in einem Magnetfeld anreichern.

Die dazugehörige µMACS-Säule wurde in ein Magnetfeld gebracht und mit 100 µl „Protein-Solution“-Puffer äquilibriert und mit 200 µl Inkubationspuffer gewaschen. Die Säule wurde anschließend mit den RNA-Phagen-µMACS Streptavidin-Gemisch beladen und die nicht gebundenen Phagen wurden mit 3x600 µl Inkubationspuffer gewaschen. Anschließend wurden die bindenden Phagen mit der Zugabe von 3x 100 µl 0,2 M Glycin pH 2,2 eluiert und folgend mit 45µl 1M Tris-HCl pH 9,1 neutralisiert.

Dieser Phagen-Pool wurde dann in 25 ml Kulturflaschen amplifiziert, titriert und auf eine Konzentration auf etwa 2×10^{11} Phagen in 10 µl gebracht. Mit diesem amplifiziertem Phagen Pool wurde dann eine zweite Selektionsrunde und nach erneuter Amplifikation eine dritte Selektionsrunde durchgeführt. Mit jeder Selektionsrunde wurde die Tween-20 Konzentration im Inkubationspuffer von 0,05% über 0,3% auf 0,5% erhöht. Nach der letzten Selektionsrunde wurde eine negative Selektion angefügt. Zu den eluierten Phagen wurde 600ng einer nicht-Target RNA gegeben, welche ebenfalls mit dem Biotin-und Fluorescein-ODN versehen

war. Die Phagen wurden mit der RNA inkubiert, auf die Säule aufgetragen und die durchgeflossenen Phagen wurden aufgefangen. Diese Phagen wurden dann getitert und zehn einzelne Phagen Klone wurden angeimpft, deren DNA nach Phagen Präp dann vom M13 Primer aus sequenziert wurde, um die Sequenz des exprimierten Peptides zu erhalten. Um den Selektionsdruck auf die Phagen zu erhöhen, wurde ein Kompetitionsschritt nach der Elution der selektierten Phagen eingeführt. Die Vorgehensweise ist ähnlich der oben beschriebenen, jedoch mit kleinen Änderungen:

Die Phagen wurden nicht durch eine pH-Veränderung eluiert, sondern durch wegnehmen des Magnetfeldes. Infolgedessen befindet sich im Eluat neben den Phagen auch die RNA, gegen welche selektioniert wurde. Diese Elutionsmethode soll etwaige Puffereffekte auf die Bindung ausschließen.

Zu dem ODN-RNA Hybrid wurde nun die gleiche RNA im 10fachen molaren Überschuß gegeben, wobei diese „kompetitor“ RNA die beiden Konsensussequenzen nicht besitzen, welche für die Hybridisierung mit dem Biotin und Fluorescein ODN notwendig sind. Aus diesem Grund kann die „kompetitor“ RNA nicht mit dem Biotin-ODN interagieren und wird auf der µMACS-Säule im Magnetfeld nicht zurückgehalten.

Im Reaktionsgefäß stellt sich dann ein neues Gleichgewicht mit den gebundenen Phagen zwischen der Hybrid- und der Kompetitor-RNA ein. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden bei Raumtemperatur.

Nach dieser Inkubationszeit wurde dieses Gemisch auf eine zweite µMACS-Säule aufgetragen, wobei nun der Durchfluß die spezifisch selektionierten Phagen enthält. Diese Phagen wurden dann ebenfalls amplifiziert und insgesamt wurden drei Selektionsrunden durchgeführt. Die Auswertung erfolgte dann auf die gleiche Weise wie bei der Selektion ohne Kompetitionsschritt.

2.14.3 Phagen Amplifikation

Der M13 Phage ist kein lytischer Phage und vermindert nur die Wachstumsrate der verwendeten Bakterien. Der *E. coli* Host ER2738 Stamm ist ein robuster F+ Stamm mit einer guten Wachstumsrate und entsprechend gut geeignet für die M13 Verbreitung. Zur Vermehrung des Phagen ist der F-Faktor notwendig. Dieser trägt im ER2738 Stamm ein mini-Transposom, welches eine Tetracyclin-Resistenz trägt. Bakterien, die diesen Faktor tragen, können demnach im Wachstum in der Gegenwart von Tetracyclin angereichert werden.

Das Phagen-Eluat nach einer Selektionsrunde muß für den Wiederaufbau eines neuen Phagen Pooles amplifiziert werden. Es wurden für eine Amplifikation 20 ml LB-Tetracyclin Medium verwendet welches mit ER2783 Bakterien inokuliert wurde.

Diese Kultur sollte sich in der frühen log-Phase des Wachstums befinden, um eine möglichst starke Vermehrung des Bakteriophagen zu erreichen. In dieser Phase, wird das Phagen-Eluat hinzugegeben. Nach 4 ½ Stunden Inkubation im Bakterienschüttler (37 °C, 150 rpm, Erlenmeyerkolben mit Nase) sind die Phagen so weit vermehrt, daß man sie anreichern kann.

2.14.4 Fällen von Phagen

Die amplifizierten Phagen wurden nach der Amplifikation gewöhnlich gefällt. Hierzu wurde die Kultur in SS34 Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 4 °C mit 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues SS34-Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die oberen 80% des Zentrifugates in ein neues Röhrchen überführt und mit 1/6 Volumen PEG/NaCl (20 % w/v polyethylene glycol – 8.000, 2,5 M NaCl) aufgefüllt. Anschließend wurden die Phagen über Nacht bei 4°C gefällt. Die zwei Zentrifugationsschritte und die Abnahme von nur 80 % des Überstandes dienen dazu, die Kontamination der Phagen mit Bakterien zu minimieren.

Das PEG hat dann die Eigenschaft, die Phagen nicht kovalent zu binden, so daß diese durch Zentrifugation pelletiert werden können. Am nächsten Tag wird das PEG-Prezipitat 15 Minuten mit 1.000 rpm bei 4 °C Zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wird anschließend erneut zentrifugiert und das restliche Medium mit der Pipette entnommen.

Das Pellet wird dann in 1 ml TBS-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) aufgenommen und erneut für 5 Minuten zentrifugiert um restliche Bakterienzellen zu pelletieren. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wird mit 1/6 V PEG/NaCl erneut gefällt (1 Stunde auf Eis). Das Prezipitat wird dann zweimal zentrifugiert (10 Minuten, 10.000 rpm, 4 °C) und dazwischen jedes Mal der Überstand abgenommen. Das Pellet wird dann in 200 µl TBS, 0,02% Na-Azid resuspendiert. Um etwaige PEG-Komplexe zu entfernen wurde erneut zentrifugiert und der Überstand überführt. Dieser Überstand ist das amplifizierte Eluat.

2.14.5 Bestimmung der Phagen MOI: Titrierung der Phagen

Um zu ermitteln, wie viele Phagen vorhanden sind, wurden diese getitert. Bei der Titerung macht man sich die α - ω -Komplementation des lacZ Genes zu nutze, welche zwischen den verwendeten *E.coli* Stamm ER2738 und den Bibliothekenphagen stattfinden kann. Man erhält auf diese Weise blaue Kolonien auf IPTG-X-Gal -Platten, wobei man durch Zählen und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors auf die Zahl des Phagen schließen kann.

Die Anzahl der Kolonien ist linear, wenn die MOI viel kleiner als eins ist; d.h. die Bakterien müssen demnach im Überschuß vorhanden sein. Ausplatieren mit einer niedrigen MOI erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß jedes Plaque nur eine DNA Sequenz enthält.

Eine einzelne Kolonie ER2783 wird in 5 ml LB(tet)-Medium inokuliert und bis zur mittleren log-Phase wachsen gelassen. Von den Phagen wird dann eine serielle Verdünnung vorbereitet, wobei die Titer im Fall nach einer Amplifikation im Bereich zwischen 10^8 - 10^{11} pfu liegt. Währenddessen werden für jede Phagen-Verdünnung Kulturröhrchen vorbereitet, welche 3 ml flüssige Agarose enthalten. Diese temperiert man bei 45 °C. Es werden dann 200 µl Kulturmedium mit den Bakterien, 10 µl von jeder seriellen Verdünnung zusammengegeben, gevortext und fünf Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen.

Die infizierten Bakterien werden dann zu der Agarose gegeben, zentrifugiert und auf vorgewärmte IPTG-X-Gal-Platten (Für 1 Liter: 1,25 g IPTG und 1 g X-Gal) mit LB(tet) gegeben. Die für Bakterien unverdauliche Agarose läßt die Bakterien als definierte Punkte wachsen, was dazu führt, daß sich gut sichtbare Kolonien bilden, bei denen das Zusammenwachsen mit Nachbarkolonien durch die Agarose erschwert wird. Die Platten werden bei 37 °C im Bakterienbrutschrank über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erhält man durch zählen der blauen Kolonien unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Zahl der Phagen.

2.14.6 Charakterisierung der bindenden Phagen

2.14.7 Phagen-Kolonien Amplifikation

Diese Amplifikation wird genauso durchgeführt, wie die Amplifizierung der Phagen, jedoch wird ein kleinerer Ansatz gewählt. So wird eine ER2738 über Nachtkultur 1:100 mit LB-Medium (tet) verdünnt. Einzelkolonien, die positiv bei der Blau-Weiß-Selektion sind und welche von Platten kommen, auf denen nicht mehr als 100 Kolonien wachsen, werden in 1ml Kulturmedium angeimpft. Diese werden dann für 5 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wird das Medium in Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert, um ein Bakterienpellet zu erhalten. Die oberen 80 % des Überstandes werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser amplifizierte Plaque kann nun bei 4 °C einige Wochen oder als Glycerolkultur (1:1 Glycerol) bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.14.8 Phagen Lysis

Um an die genetische Information der Phagen zu kommen, muß man die Phagen lysieren und die Phagen DNA fällen. 500 µl einer amplifizierten Kolonie werden zu diesem Zweck mit 200 µl PEG/NaCl inkubiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließendes Zentrifugieren pelletiert die Phagen. Das Pellet wird dann in 100 µl Jod-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 4 M NaI) resuspendiert.

Durch die hohe Salzkonzentration wird der Phage lysiert und die DNA befindet sich frei in Lösung. Nach der Zugabe von 250 µl Ethanol wird für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hier fällt präferentiell die DNA aus, während die Phagen Proteine in Lösung bleiben. Anschließendes Zentrifugieren pelletiert die DNA. Nach waschen mit 70 % Ethanol und trocknen in der Speedvac, wird die DNA in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) aufgenommen.

2.14.9 Sequenzierung der Phagen-DNA und deren Auswertung

Die Phagen DNA wurde ausgehend vom -96 gIII Primer (TGT ATG GGA TTT TGC TAA ACA ACT) sequenziert. Hierzu wurde etwa 1 µg DNA mit 1 pmol Primer versetzt und vom hauseigenen Sequenzierservice sequenziert.

In der pIII Sequenz befindet sich die Sequenz des 7mer bzw. 12mer Fusionspeptides, das von den Phagen präsentiert wurde. Zum Übersetzen des genetischen Codes in Aminosäuren, wurde der reduzierte genetische Code der Bibliothek verwendet. Das Amber Stop-Kodon TAG steht in der Bibliothek für Gln.

Alle 20 Aminosäuren werden hier mit nur 32 Kodons dargestellt. Dies erhöht zum einen die relative Häufigkeit derjenigen Aminosäuren mit nur einem Kodon und es werden dadurch 2 von 3 Stop Kodons entfernt.

		Zweite Position					
		T	C	A	G		
Erste Position	T	Phe Leu	Ser Ser	Tyr Gln	Cys Trp	T	Dritte Position
	C	Leu Leu	Pro Pro	His Gln	Arg Arg	T	
	A	Ile Met	Thr Thr	Asn Lys	Ser Arg	T	
	G	Val Val	Ala Ala	Asp Glu	Gly Gly	T	
	G					G	

Tab. 2-9. Der genetische Code des Phagen wurde mit diesem Schlüssel ausgewertet. Von dem Schnittpunkt der Horizontalen (erste Position) und der Vertikalen (zweite Position) wählt man dann diejenige Aminosäure aus, welche in der Spalte das Nukleotides der dritten Position liegt. So kodiert die Abfolge AAG ein Lysin.

2.15 Biophysikalische Methoden

2.15.1 Gelelektrophorese

DNA und RNA Moleküle besitzen ein Zucker-Phosphat-Rückgrat, welches ihnen negative Ladungen verleiht. Sie wandern daher zur Anode. Größere Moleküle werden dabei von den unterschiedlich stark vernetzten Gelen stärker zurückgehalten. Je nach Anwendung wurden native oder denaturierende, Agarose oder Polyacrylamid-Gele verwendet.

2.15.2 Agarosegele

Zur Auftrennung von DNA und RNA wurden je nach zu erwartenden Fragmentgrößen 0,5 bis 3%ige Agarosegele verwendet. Die Porengröße bei 1% Agarose beträgt etwa 150 nm und ist entsprechend großporig. Während des Abkühlens bilden sich aus dem Polysaccharid Doppelhelixes aus, die sich in Gruppen zu relativ dicken Fäden zusammenlagern. Diese

Struktur verleiht den Agarosegelen hohe Stabilität bei großen Porendurchmessern. Zur Herstellung eines 3%igen Geles wurden 3 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 7,8, 5 mM EDTA) in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt und gelöst. Nach dem Abkühlen wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben, auf einem Gelträger gegossen und mit einem Probenkamm versetzt.

Nach dem Gelieren des Geles, wird der Probenkamm entfernt und in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet. Um eine bessere Beladung der Proben in die Geltaschen zu ermöglichen, werden diese in 5x Auftragspuffer aufgenommen (20% w/v Ficoll 400, 100 mM EDTA, 0,025% w/v Xylencyanol, 0,025% w/v Bromphenolblau) und das Gel beladen. Das Gel lief mit einer Spannung von 100 V bei einem Elektrodenabstand von 10 cm.

Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen und Mengen wurde ein DNA-Größenstandard mit auf das Gel aufgetragen. Aufgrund der Einlagerung des Ethidiumbromids fluoresziert die DNA bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) rot-orangefarbig. Deshalb konnten die Nukleinsäure-Fragmente auf einem Transilluminator angesehen und bei Bedarf fotografiert werden.

2.15.3 Polyacrylamid-Gele

Die chemisch inerten PAA-Gele entstehen durch chemische Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer, N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Porengröße ist abhängig von der Acrylamidkonzentration und dem Vernetzungsgrad. Die Poren haben bei 5% Acrylamid und 3% Vernetzung eine Größe um 5 nm. Die Polymerisation erfolgt unter Luftabschluß, da Sauerstoff zum Kettenabbruch führt.

Denaturierende Gele wurden verwendet, um die RNA Struktur zu unterdrücken, so daß die Nukleinsäure nur nach ihrer Länge aufgetrennt wird, nicht aber nach ihrer Sekundärstruktur und entsprechend einer veränderten Ladungsverteilung. Die denaturierenden Gele wurden auch für den ALFexpress Gellauf verwendet. Ein denaturierendes 16% PAA Gel mit 8M Harnstoff wurde folgendermaßen bereitet: Für 10 ml wurden 1ml 10x TBE (1 M Tris, 0.8 M Borsäure, 10 mM EDTA), 16 % Endkonzentration von 40 % Acrylamid Stock (40 % Stocklösung mit einem Verhältnis von 19:1 Acrylamid:Bisacrylamid), 8 M Harnstoff aufgefüllt auf 10 ml Wasser verwendet. Der Harnstoff wurde in Hitze aufgelöst und nach dem Abkühlen wurden 100 µl APS und 10 µl TEMED hinzugegeben und das Gemisch in eine vertikale Gelelektrophoreseapparatur gegossen. Nach Polymerisierung des Geles, wurde es mit den Proben beladen und in 0,5x TBE-Puffer zum Laufen gebracht. Die Gele liefen bei 220 V für mehrere Stunden bei Raumtemperatur.

2.15.4 Bestimmen der DNA/RNA Konzentration

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden entweder durch semiquantitative Agarosegele oder UV-Spektrometrisch bestimmt. Die Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Für die Absorption sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Die Absorption wird bei 260 nm in Quartzküvetten gemessen.

Nicht basengepaarte Nukleinsäuren besitzen bei 260 nm eine höhere Absorption, so daß für einzelsträngige DNA ein anderer molarer Absorptionskoeffizient gilt, als für doppelsträngige DNA. Tab. 2-10 gibt einen Überblick darüber.

1OD ₂₆₀ entspricht	50 µg/µl	Doppelsträngige DNA
	40 µg/µl	Einzelsträngige DNA
	33 µg/µl	Einzelsträngige RNA

Tab. 2-10. Beschreibt die unterschiedlichen molaren Koeffizienten unterschiedlicher Nukleinsäuren

Aus dem Quotienten OD 260/280 kann darüber hinaus eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure getroffen werden. Reine RNA besitzt einen Quotient von zwei.

Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, so daß der Quotient abnimmt, wenn die Probe mit Proteinen oder Phenol verunreinigt ist.

Zur Quantifizierung der Nukleinsäuren im Agarosegel wurde ein Marker verwendet, der es zuläßt, neben der Länge auch die Menge der eingesetzten Nukleinsäure abzuschätzen. Der DNA-SmartLadder geht von 200 nt bis 10.000 nt Länge und von 15 ng bis 100 ng Menge. Hierzu wurden 5 µl von dem Marker auf das Gel mit aufgetragen.

2.15.5 Fluoreszenz Korrelations- Spektroskopie (FCS)

FCS ist eine Methode, die es erlaubt, Diffusionsgeschwindigkeiten von fluoreszenzmarkierten Proben zu ermitteln. Gemessen wurde am ConFoCor II von Zeiss. Das konvokale Volumen ist das „Auge“ des Gerätes. Hier werden die Farbstoffe angeregt und die Emission gemessen.

Die Bewegung der Proben kommt durch die Brownsche Molekularbewegung zustande. Da die Meßmethode auf der Auswertung von Fluoreszenzfluktuationen besteht, darf die

Konzentration von markierten Proben im konvokalen Volumen nicht zu hoch sein. Der Volumeninhalt des konvokalen Volumens ist kleiner als $\frac{1}{4}$ femto Liter. So befinden sich z.B. in 1 ml einer 1 nm Lösung im Mittelwert 0,6 Moleküle in dem konvokalen Volumen. Diese Fluoreszenzfluktuation wird nun durch den Laser verfolgt und gelangt schließlich an den Detektor, einer Avalanche Photodiode, welche bis zu 1 Million Fluoreszenzphotonen pro Sekunde und pro Farbstoff detektieren kann.

Laser	Wellenlänge [nm]	Energie [mW]
Ar Ion	458	>3
	477	>10
	488	>10
	514	>15
HeNe „grün“	543	>1
HeNe „rot“	633	>5

Tab. 2-11. Die drei verschiedenen Laser des ConFoCors können 6 unterschiedliche Wellenlängen emittieren. In den durchgeführten Experimenten wurde der HeNe Laser mit 633 nm zur Anregung von Cy5 verwendet. R6G wurde mit der Laserlinie 488 nm des Ar Ionen Lasers angeregt.

Da die Farbstoffe eine wichtige Rolle spielen, müssen diese bestimmte Eigenschaften erfüllen:

- So sollte die Quantenausbeute höher als 0,2 liegen.
- Die Wahrscheinlichkeit für ein inter system crossing, daß heißt den Übergang in einen Tripletzustand (T3) mit strahlungsloser Abgabe der Energie sollte möglichst gering sein. Dieser Übergang führt
 - zu einer reduzierten Fluoreszenzintensität,
 - zu einer Abnahme der Photostabilität
 - zu einem reduzierten Signal zu Rausch-Verhältnis.

Die T3 Lebenszeit in Wasser beträgt 0,5 bis 10 μ s und ist viel kürzer als die Diffusionszeit einer markierten Probe. Jedoch kann der T3-Zustand im ungünstigsten Fall ein eigenes Fluktuationssignal hervorrufen, wenn ein Chromophor bei dem Durchgehen durch das konvokale Volumen diesen Zustand permanent erreicht. Insofern sollte der T3-Anteil bei einer Messung 20 % nicht überschreiten.

- Die fluoreszenz Lebenszeit sollte möglichst kurz sein.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über gängige Chromophore.

Farbstoff	Excitation [nm]	Emission[nm]	Laserlinie [nm]
Alexa Flour 488	495	519	488
Cy5	649	670	633
Rhodamin-6-G	525	555	514,543

Tab. 2-12. Diese Chromophore sind gut geeignet für die Messung am ConFoCorII. Sie besitzen eine gute Quantenausbeute, eine kurze fluoreszenz Lebenszeit und besitzen eine gute Quenchzeit.

Das Gerät kann Proben mit Autokorrelation vermessen. Bei der Autokorrelation ist es notwendig, daß sich die Interaktionspartner um den Faktor 2 bei der Diffusionszeit unterscheiden. Dies entspricht einem Massenunterschied von 1:8. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, dann genügt es, den leichteren Interaktionspartner zu markieren um verschiedenen Diffusionszeiten zu messen.

Bei den durchgeführten Messungen sind die Massenunterschiede der RNA und der Phagen ausreichend groß, so daß alle Proben mit Autokorrelation vermessen werden können.

2.15.6 Ermitteln der Phagen-RNA Interaktion

2.15.7 Allgemeine Konfiguration des ConFoCorII

Software	Carl Zeiss, Fluorescence Correlation Microscope ConfoCor II, Version 3.2 SP1, Windows 2000 SP3
Beam Path R6G	Standard_488-Rh6G, HFT 488, BP 530-600, Chanel 2 blau, 488 Excitation 5% ,Collimator 23, Pinhole Diameter 70µM, Position calibrate
Beam Path Cy5	Standard_633-Cy5, HFT 633, LP 650, Chanel 1 rot, 633 Excitation 5%, Collimator 23, Pinhole Diameter 90µM, Position calibrate
Messungen	Bleach time 3s, measure time 90s, repeat counts 10

Tab. 2-13. Die Einstellungen für die Chromophoren R6G und Cy5 entsprachen den Standard-Einstellungen. Eine Messung setzte sich aus zehn Einzelmessungen zusammen, wobei jede 90 Sekunden lange war. Die Auswertung erfolgte mit dem ConFoCorII Software Paket.

Für die FCS Messung wurden Phagen verwendet, die in 25 ml Medien amplifiziert wurden. Nach dem Waschen und Fällern wurden die Phagen in 50 µl sterilfiltriertem PBS gut resuspendiert. Die Konzentration der RNA mit den entsprechenden Chromophoren Linker wurde auf 200 nM sterilfiltriertem PBS verdünnt. PBS und Phagen geben keine Fluoreszenzsignale im FCS. Bei den Messungen war jeweils noch 1 µg/Ansatz tRNA sowie RNase Inhibitor vorhanden. Die Proben wurden vor der Messung acht Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Messung selbst wurde bei 20 °C durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde die Diffusionszeit ermittelt.

2.15.8 FCS-Kompetitionsexperimente mit kompetitor RNA oder synthetisiertem Peptid

Die Einstellungen und Probenvorbereitung sind identisch zu den nicht kompetitiven Experimenten. Es wurde hier jeweils ein 5facher molarer Überschuß an kompetitor RNA oder an synthetisiertem Peptid zu den Proben gegeben. Die kompetitor RNA entsprach der gelabelten RNA, jedoch fehlt dieser die zur Interaktion mit dem Chromophor-Markiertem Oligonukleotid notwendige Bindesequenz, so daß diese RNA auf jeden Fall im FCS kein Signal gibt. Die bis zu 96% reinen, lyophilisierten Peptide wurden in PBS resuspendiert und die entsprechende Menge zu den kompetitions Proben gegeben. Bei diesen Versuchen wurden zur Auswertung nicht nur die Diffusionszeiten herangezogen, sondern auch die Anteile der verschiedenen Populationen wurden berücksichtigt.

2.15.9 Cirkulardichroitische Titrationsexperimente

Cirkulardichroismus ist eine spektroskopische Methode, die auf dem Effekt basiert, daß chirale Moleküle mit linear polarisiertem Licht unterschiedlich interagieren. Linear polarisiertes Licht besteht aus links- und rechtsgängig zirkulär polarisiertem Licht gleicher Frequenz, Wellenlänge und Intensität. Da der Lichtstrahl eine helikale Bahn beschreibt, ist zirkulär polarisiertes Licht chiral. Die Wechselwirkungen dieser beiden Lichtstrahlen mit einem chiralen Molekül sind unterschiedlich.

Besteht eine Substanz nur aus chiralen Molekülen der gleichen absoluten Konfiguration, dann kann man unterschiedliche Brechzahlen n_L und n_R messen und bekommt außerdem in den Absorptionsgebieten unterschiedliche Absorptionskoeffizienten ϵ_L und ϵ_R des Lichtes. Innerhalb von Absorptionsbanden wird links und rechts zirkulär polarisiertes Licht verschieden stark absorbiert. Die Differenz $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ wird dann Cirkulardichroismus

genannt. Durch die unterschiedliche Schwächung von links und rechts zirkulär polarisiertem Licht sind auch die ursprünglich gleichen Intensitäten IL und IR verschieden geworden. Das linear polarisierte Licht ist nun elliptisch polarisiert. Die CD-Spektroskopie kann Informationen über die Sekundär- und Tertiärstruktur von RNA-Molekülen liefern.

2.15.10 Nachweis der Peptid-RNA Interaktion

2.15.11 Allgemeine CD-Spektrometer Einstellungen

Die allgemeinen Einstellungen sind: Temperatur $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$, Wellenlängenbereich 200-350 nm, Resolution 0,1 nm, Bandwidth 1,0 nm, Sensitivity High 5 mdeg, Response 2 sec., Speed 100 nm/min, Cell length 2 mm, Accumulation 10, Data Array type Linear data array *2, Erwartete Datenpunkte pro Messung: 1500, RNA-Konzentration 1 μM .

Um die Interaktion der Peptide mit der RNA zu testen, wurde 1 μM b2a2- oder nicht-target RNA vorgelegt und nach jeder Zugabe von einer definierten Menge Peptid wurde ein CD-Spektrum aufgenommen. Die RNA wurde durch In-vitro-Transkription gewonnen und wurde durch DNase I Verdau und PAGE gereinigt. Die Titration erfolgt in PBS-Puffer, so daß zunächst eine Basislinie mit dem Puffer aufgenommen wird, welche jedes Mal von den Spektren dann automatisch abgezogen wurde. In etwa 10 μM -Schritten wurde das Peptid hinzugegeben. Dies wurde solange wiederholt, bis die Meßwerte eine Sättigung zeigen. Die gewonnenen Spektren wurden nun übereinandergelegt und die Meßpunkte vom Maximalpunkt ausgehend gegen die Peptidkonzentration aufgetragen. Durch diese Punkte wurde eine Boltzmannverteilung gelegt. Mit dieser ist es möglich, zwei verschiedene RNA-Populationen zu beschreiben. Zum einen die freie RNA und zum anderen die gebundene RNA. Der Wendepunkt entspricht der halbmaximalen Änderung der RNA-Struktur und ist gleichbedeutend mit dem K_D -Wert der Interaktion. Wenn demnach eine Interaktion in dem Peptidkonzentrationsbereich beobachtet werden kann, so hat diese Funktion einen sigmoidalen Verlauf. Findet eine schwache Interaktion statt, so hat diese Funktion einen linearen Verlauf, da sich hier keine zwei verschiedenen RNA-Populationen bilden können.

2.15.12 Ermitteln des Interaktionsortes der Peptide mit der RNA

Bei dem Nachweis der Peptid-Mutanten-RNA Interaktion wurden die gleichen Einstellungen des Spektrometers und Vorgehensweisen angewandt. Um den Interaktionsort der Peptide 12 und 14 zu ermitteln, wurden zunächst, ausgehend von dem b2a2-Strukturmodell, Oligonukleotide synthetisiert, welche Mutationen oder Deletionen in den verschiedenen strukturellen Bereichen besitzen. Mit den mutierten RNAs und den beiden Peptiden wurden nun CD-Spektren aufgenommen und es wurde nach Interaktion geprüft. Sollte Interaktion meßbar sein, so spielt dieser mutierte RNA-Bereich keine Rolle bei der Interaktion. Ist jedoch die Interaktion nicht mehr nachweisbar, so muß dieser mutierte RNA-Bereich eine Rolle bei der Peptid-RNA Interaktion spielen.

3 Ergebnisse

3.1 Sekundärstrukturanalyse der Ziel-RNA durch MFOLD

Zur Ermittlung von mRNA-Bereichen, die die Möglichkeit besitzen, Sekundärstrukturelemente auszubilden, wurde das Programm MFold Version 3.1 von Zuker verwendet. Dieses einfach zu bedienende Programm ermöglicht eine schnelle Strukturanalyse einer RNA. Als Ziel RNA wurde hier die bcr-abl mRNA verwendet. Diese mRNA kodiert für das chimäre BCR-ABL Protein, das für die maligne Transformation bei Philadelphia-Positiven Leukämien verantwortlich ist und ist insofern ein interessantes Target für die mögliche Behandlung dieser Art von Leukämien. Da keine Strukturinformationen für die BCR-ABL mRNA vorhanden sind, wurde die BCR-ABL mRNA mit diesem Programm analysiert. Dadurch sollen strukturelle Bereiche der p210 bcr/abl mRNA gefunden werden, die als Target für eine RNA-Liganden Interaktion verwendet werden können.

Um zunächst zu überprüfen, ob es möglich ist, eine bekannte RNA Sekundärstruktur innerhalb einer frei gewählten RNA mit dieser Methode zu finden, wurde der strukturgebende TAR-RNA-Bereich in eine frei gewählte RNA eingefügt und dem MFold-Server zur Strukturanalyse übermittelt. Der TAR-Bereich ist eine gut charakterisierte RNA Struktur, welcher bei der Transkription des HIV-Virus eine entscheidende Rolle spielt.

Zunächst erstellt der MFold-Server eine Strukturvorhersage über die TAR-RNA Sequenz. In Abb. 3-1 ist das Resultat dargestellt. Unter „A“ ist die von MFold errechnete Strukturvorhersage der TAR-RNA Struktur gezeigt. Sie setzt sich zusammen aus einem 6 nt langen Stamm – beginnen von Nukleotid 1 bis 6 und 24 bis 29 – einem 4 nt langen Stamm – beginnen von Nukleotid 10 bis 14 und 20 bis 23 – zusätzlich dazu einen 6 nt großen Loop und ein 3 nt langer, einzelsträngiger RNA Bereich. Die gleiche Information erhält man aus den ΔrG -Diagrammen, welches für die TAR-RNA in Abbildung 3-1 unter „B“ dargestellt ist. In dieser Art von Diagrammen sind 2-Dimensional die Interaktionspartner (Schnittpunkt x;y) und Interaktionsstärke (farbkodiert) zwischen den Nukleotiden dargestellt. Auch hier erkennt man 6 nt und 4 nt lange Interaktionsbereiche, welche mit der von MFold errechneten TAR-Struktur korrelieren.

Da der MFold Server nur eine mögliche Struktur für die RNA Sequenz von TAR vorhersagt, entfällt das DoT-Diagramm. In diesem Dot-Diagramm können alle errechneten Strukturvorhersagen der RNA übereinandergelagert werden, so daß erkannt werden kann, welche lokalen Strukturen in vielen bzw. in allen Strukturvorhersagen der RNA vorkommen. Man erhält somit aus der Kombination von ΔrG - und Dot-Plot die Aussage, ob eine

bestimmte errechnete Strukturvorhersage zum einen thermodynamisch stabil ist und zum anderen eine entropische Prävalenz gegeben ist.

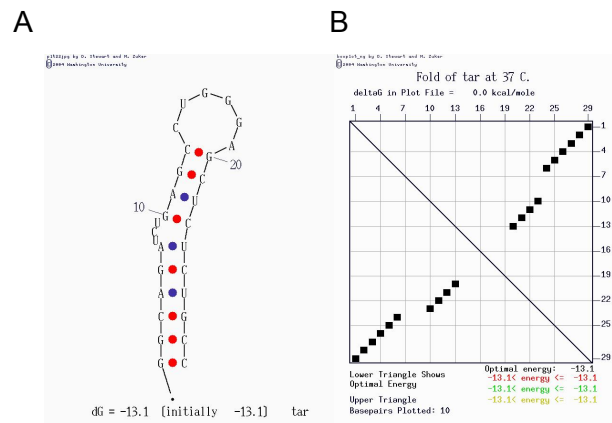


Abb. 3-1. Diese beiden Diagramme zeigen das Ergebnis der Strukturvorhersage der TAR-RNA durch Mfold. Unter „A“ ist die errechnete Struktur dargestellt. Sie besitzt eine Stabilität von -13 kcal/mol und besteht aus einem 6 nt langen Stamm, eine 4 nt langen Stamm, der durch eine Fahlpaarung unterbrochen ist. Abgerundet wird diese Struktur durch einen 6 nt langen Loop. Unter „B“ ist ein Basen-Paar-Interaktions-Diagramm dargestellt. Punkte repräsentieren eine Interaktion zwischen zwei verschiedenen Basen (dargestellt auf der x und y Achse). Es ist eine Interaktion zwischen Nukleotid 1 und 29 zu erkennen, welche 6nt lang ist. Es folgt ein 4nt lange Interaktion beginnend mit Nukleotid 10 und 23.

Diese TAR-Sequenz wurde nun in eine willkürlich ausgewählte 500 nt lange RNA-Sequenz an der Nukleotidposition 350 eingebettet und diese RNA erneut durch Mfold analysiert.

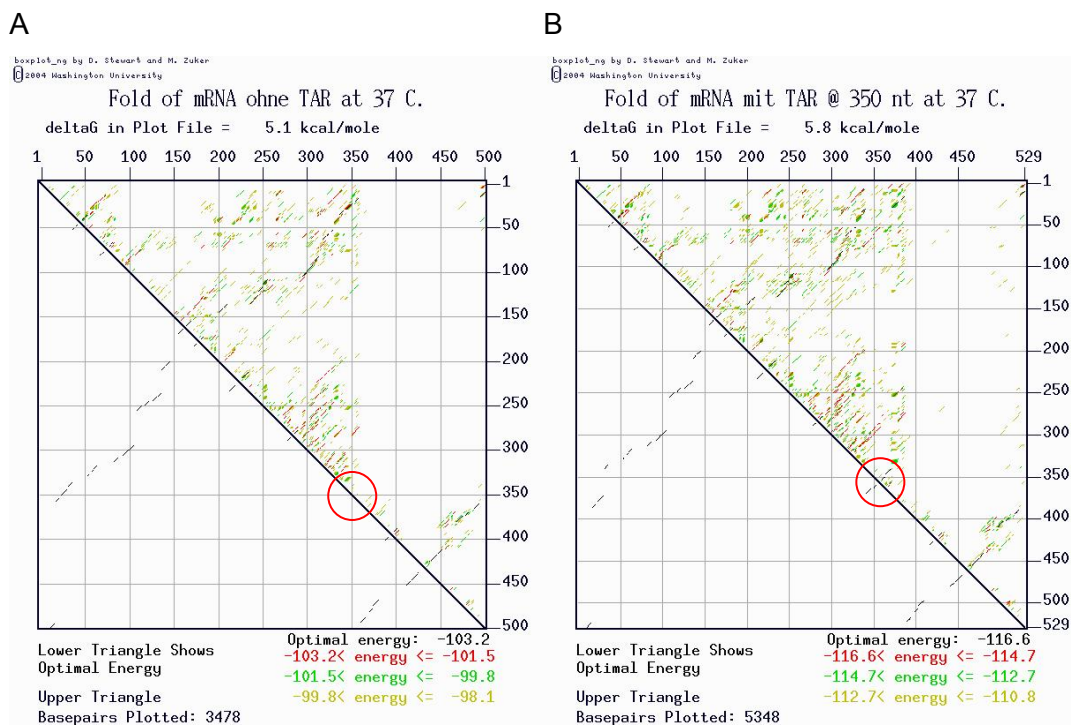


Abb. 3-2. Es ist ein Basenpaar-Interaktions-Diagramm gezeigt. Eine frei gewählte 500 nt lange RNA wurde durch Mfold der Strukturanalyse unterzogen. Das Ergebnis ist unter „A“ zu sehen. Es sind Interaktionen zu erkennen, von denen die stabilsten Interaktionen links von der Diagonalen zu finden sind. An der Stelle 350 nt (roter Kreis) ist keine Interaktion zu finden. Wird nun an diese Stelle die TAR-RNA-Sequenz eingefügt und durch Mfold erneut analysiert, so kann man bei 350 nt eine Interaktion erkennen (Diagramm „B“). Es ist also möglich, stabile Strukturen innerhalb einer RNA zu finden.

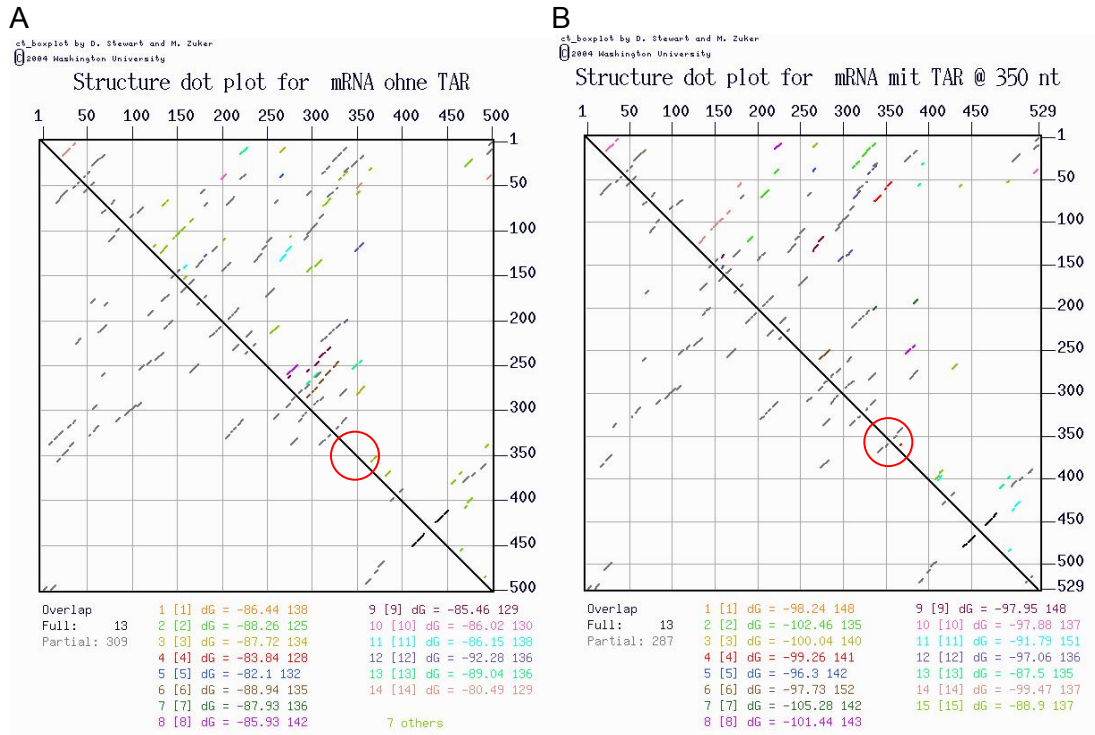


Abb. 3-3. Neben der Basenpaar-Interaktionsstärke (Abb. 3-2), kann durch MFold auch die Häufigkeit von Strukturen innerhalb der Strukturvorhersage ermittelt werden. Diese Abb. zeigt die Überlagerung aller möglichen Vorhersagen, die MFold errechnet hat. Eine Interaktion, die häufig bei allen Vorhersagen vorkommt, findet man links von der Diagonalen.

Unter „A“ ist die RNA ohne die TAR-Struktur bei 350 nt dargestellt, unter „B“ wurde die TAR-Struktur bei 350nt eingefügt und analysiert. Es ist zu erkennen, daß die TAR-RNA Struktur in vielen Vorhersagen vorkommt.

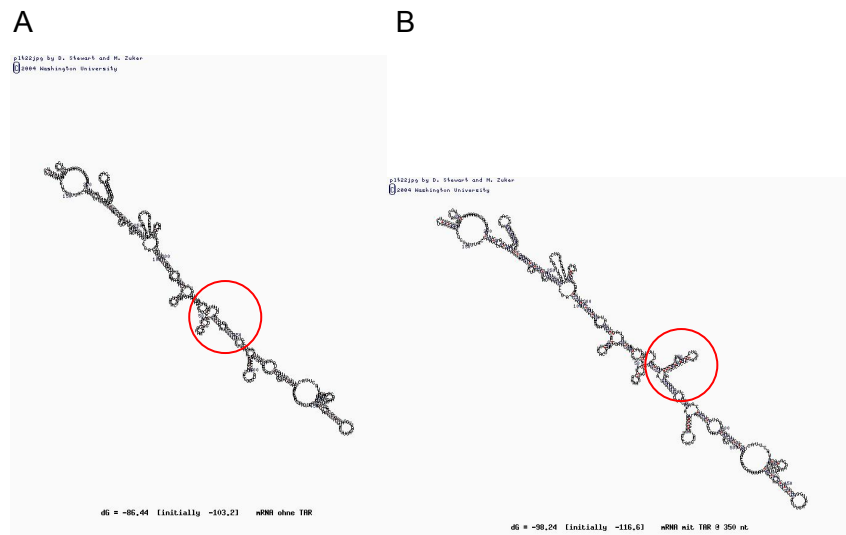


Abb. 3-4. Die von MFold errechnete Strukturvorhersage der RNA ist hier dargestellt. Der rote Kreis bezieht sich auf die Stelle 350 nt, an welcher die TAR RNA eingefügt wurde (unter „B“). Der Δ rG-Plot (Abb. 3-2) sagte eine thermodynamisch stabile Struktur an dieser Stelle voraus und der Dot-Plot (Abb. 3-3) gibt eine kinetische Prävalenz dieser Struktur an. Bei dieser Darstellung kann man nun die errechnete TAR-Struktur innerhalb der gewählten RNA erkannt werden.

Unter „A“ der Abb. 3-2 bis 3-4 ist die RNA-Strukturvorhersage für die 500nt lange RNA ohne die TAR-Sequenz dargestellt. Unter „B“ wurde die gleiche RNA verwendet, wobei die TAR-Sequenz bei Nukleotid 350 eingefügt wurde.

Im Δ rG-Diagramm (Abb. 3-2) erkennt man bei Nukleotid 350 eine Strukturvorhersage der TAR-Struktur, wenn die TAR-RNA Sequenz dort eingefügt wurde (Abbildung B). An dieser Stelle konnte keine Interaktion von MFold ermittelt werden, wenn dieser TAR-Bereich fehlt (Abbildung A). Da MFold unterschiedliche Ergebnisse für die RNA errechnet, liefert auch das Dot-Diagramm (Abb. 3-3) ein Resultat.

Insgesamt lieferte MFold 21 verschiedene Strukturvorhersagen ohne TAR- und 15 mit der eingefügten TAR-Sequenz. Diese Strukturvorhersagen wurden im Dot-Diagramm übereinandergelegt. Interaktionen, die sehr häufig, wenn nicht überall vorkommen, sind auf der Diagonalenseite nach links gespiegelt. Hier erkennt man ebenfalls einen strukturellen Bereich um Nukleotid 350 bei der RNA mit der eingefügten TAR-Sequenz. Schließlich sind die jeweils stabilsten Strukturvorhersagen der RNAs dargestellt (Abb. 3-4).

Es konnte am Beispiel der TAR-RNA Struktur gezeigt werden, daß es möglich ist, stabile strukturelle Bereiche innerhalb einer unbekannten RNA durch MFold vorherzusagen.

3.1.1 Analyse der bcr-abl RNA

Da die Analyse einer RNA nur bis zu einer Länge von 3.000 nt möglich ist und die bcr-abl mRNA eine Gesamtlänge von 8.300 nt besitzt, ist es notwendig, diese in kleinere Bereiche aufzuteilen und getrennt voneinander der Strukturanalyse von MFold zu unterziehend. Die bcr/abl mRNA wurde entsprechend in drei RNA-Fragmente aufgeteilt, die unabhängig voneinander von MFold analysiert wurden. Es wurden dann nach der Analyse Bereiche definiert, die stabile Strukturelemente (Δ rG-Diagramm) und gleichzeitig entropische favorisierte Strukturelemente (Dot-Plot) beinhalten. Zudem war es wünschenswert, Strukturen auszuwählen, die kleiner als 120 nt sind und deren Interaktionspartner in unmittelbarer Nähe liegen – also Strukturen, die sich in der Nähe der Diagonalen des Δ rG- oder DoT-Diagrammes befinden.

Im ersten Schritt wurden größere Bereiche eingegrenzt, welche die Möglichkeit der Strukturfaltung besitzen. Anschließend erfolgten Analysen durch MFold, um auf die minimal notwendige strukturgebende RNA Sequenz zu schließen.

Die ersten interessanten Bereiche umfassen neben den Translokationsbereichen b2a2 und b3a2, Bereiche innerhalb der 3'- und 5'- UTR, sowie die folgenden Bereiche innerhalb der bcr/abl mRNA: 200-700, 800-1.200, 1.500-1.700, 2.000-2.300, 2.700-2.900, 3.000-3.200, 3.500-4.000, 4.200-4.500, 4.600-5.500 sowie 5.600-6.100 nt. Aus diesen Bereichen wurden

nun diejenigen Sequenzen erneut gefaltet, die für die Bildung der Struktur notwendig waren. Diese Ergebnisse wurden nun ebenfalls mit dem ΔrG - und Dot-Diagrammen ausgewertet und gleichzeitig wurde die errechnete Strukturvorhersage mit derjenigen verglichen, die während der Faltung mit längerer Sequenz errechnet wurden (Abb. 3-5 zeigt die Auswertung am Beispiel des b2a2-mRNA Translokationsbereiches).

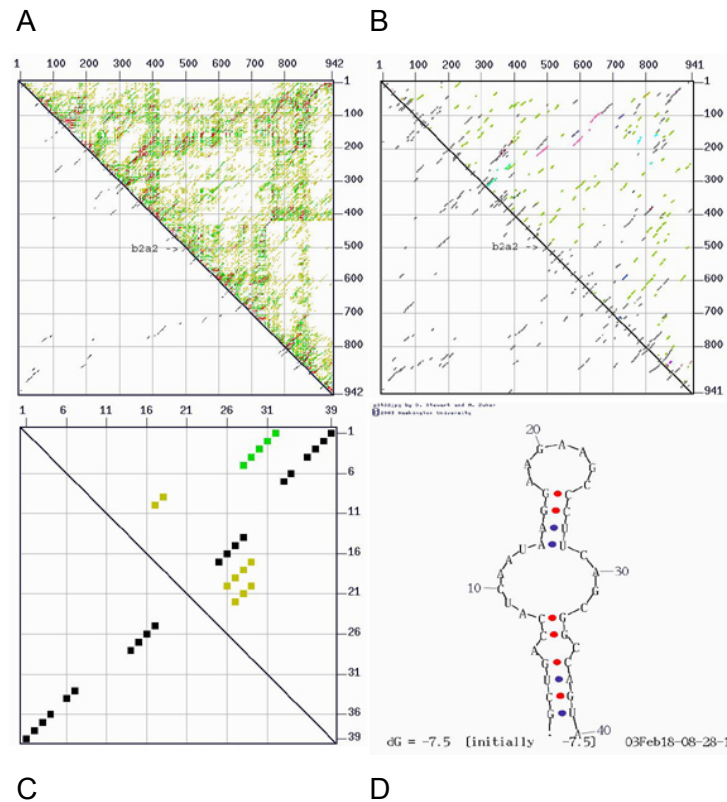


Abb. 3-5. Die Strukturvorhersage am b2a2-Translokationsbereich der BCR-ABL mRNA wurde durch MFold analysiert. Ausgehend vom ΔrG -Plot („A“) und vom Dot-Plot („B“), konnte eine stabile und kinetisch bevorzugte RNA-Struktur am Translokationsbereich (bei 500 nt) vorhergesagt werden. Unter „C“ ist die minimal notwendige RNA-Sequenz für die Struktur im ΔrG -Plot dargestellt. Unter „D“ ist die stabilste RNA Strukturvorhersage dargestellt. Diese RNA-Struktur erhielt im Folgenden die Bezeichnung „RC 10“ und wurde, neben neun weiteren Strukturen, als Ziel RNA für das Phage Display verwendet.

Für weitere Experimente wurden zehn verschiedene RNA Bereiche ausgewählt, welche die Möglichkeit besitzen, sich in eine Struktur zu falten. Tab. 3-1 gibt einen Überblick über die Länge sowie den Ort der Sequenz.

Struktur Nummer	Ort innerhalb der bcr/abl mRNA [nt]	Bereich innerhalb des bcr/abl mRNA	Länge der RNA [nt]
1	400-461	Bcr	61
2	1518-1555	Bcr	37
3	2144-2181	Bcr	37
4	2708-2751	Bcr	43
5	2776-2857	B3a2 Bereich	81
6	3920-3966	Abl	46
7	4256-4286	Abl	30
8	4830-4971	Abl	41
9	5' flanking	UTR	115
10	B2a2 Bruchpunkt	B2a2 Bereich	42

Tab. 3-1. Insgesamt wurden zehn verschiedene RNA-Bereiche durch MFold innerhalb der BCR-ABL mRNA definiert, welche die Möglichkeit besitzen, sich in Sekundärstrukturen zu falten. Ein Großteil der Strukturen besitzt eine Länge zwischen 40-50 nt und sie sind in verschiedenen Bereichen der RNA lokalisiert. 4 Strukturen stammen aus dem ABL-Teil der RNA, 3 von BCR-Teil und eine Struktur wurde aus dem 5'-UTR ausgewählt. Schließlich wurden die Translokationsbereiche b3a2 und b2a2 als Ziel-Struktur definiert.

Vier der 10 ausgewählten Strukturen liegen auf dem BCR-Bereich, drei auf dem ABL-Bereich der RNA. Zusätzlich dazu wurde die 5'-UTR ausgewählt und die therapeutisch interessanten Translokationsbereiche b3a2 und b2a2.

3.1.2 Struktur Mapping der b2a2 RNA

Für den b2a2 RNA Translokationsbereich wurde durch MFold eine Struktur vorhergesagt. Um diese Vorhersage durch experimentelle Daten zu bestätigen, wurde in Kooperation mit Dr. Scheffer aus der AG Prof. Göbel das RNase Mapping sowie das Mapping mit der künstlichen Nuklease durchgeführt.

Eine grobe Kartierung der Struktur erfolgt durch unterschiedliche RNasen. Hier wurden die einzelstrangspezifische RNase T2, die doppelstrangspezifische RNase V1 sowie die Guanodin einzelstrangspezifische RNase T1 verwendet. Nach dem partiellen Verdau der b2a2 RNA wurde eine reverse transkriptase Reaktion durchgeführt. Hierzu wurde ein Cy5-markierter Primer verwendet. Die entstehende Cy5-markierte cDNA kann durch einen Laser

im ALFexpress detektiert werden. Durch die Verwendung des Farbstoffes ist es nicht notwendig, die RNA radioaktiv zu markieren, da auch mit dem Farbstoff eine empfindliche Analytik durchgeführt werden kann, die notwendig ist, um die einzelnen Fragmente zu identifizieren.

Abb. 3-6 zeigt das Elektropherogramm des Cy5-cDNA Gellaufes. Der Peak bei 140 Minuten entspricht dem Cy5-Primer und der Peak bei 380 Minuten entspricht dem vollständigen Produkt. Die Fragmente im Zeitfenster 140 bis 380 Minuten resultieren aus dem RNase-Verdau. Da die Signale nur schwache Intensitäten aufweisen, wurde ein Ausschnitt aus dem Elektropherogramm ausgewählt (siehe Abb 3-7)

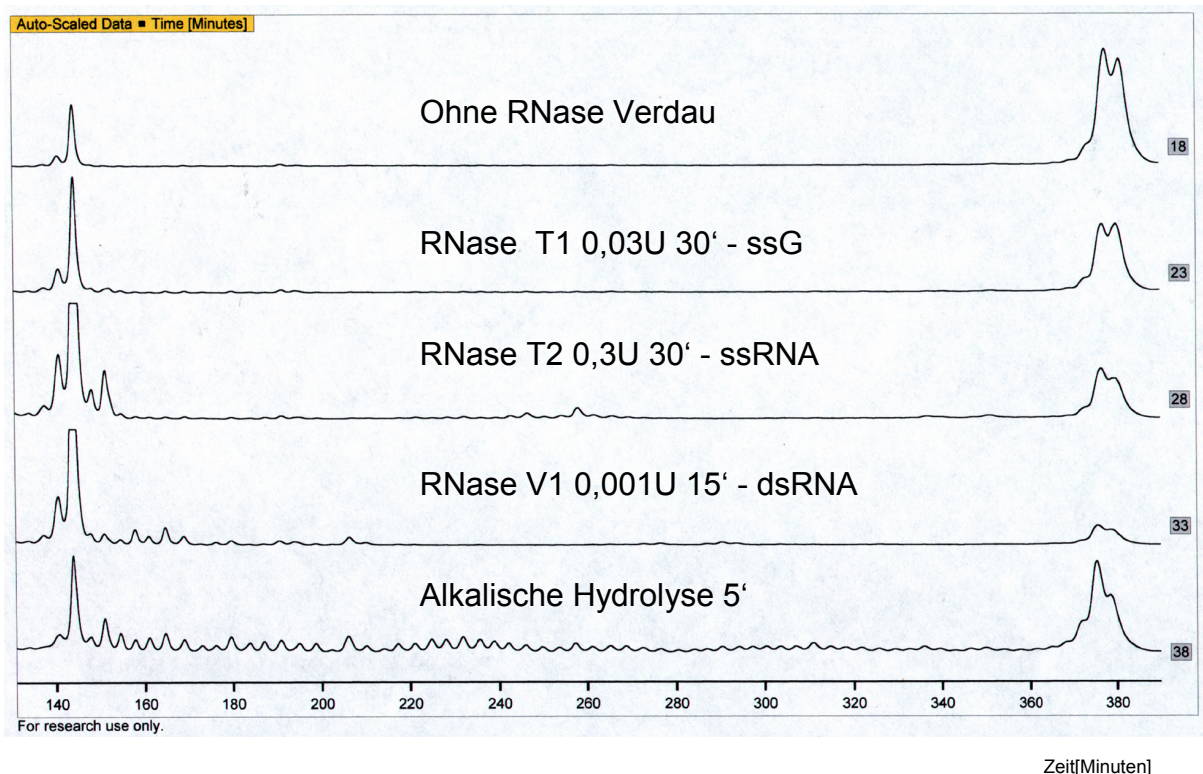


Abb. 3-6. Die Struktur des b2a2-RNA Translationsbereiches (Struktur RC10) wurde durch RNase-Mapping charakterisiert. Diese Abbildung zeigt den ALF-Gellauf der partiell verdauten RNA, die durch eine rt-Reaktion in Cy5-Markierte cDNA umgeschrieben wurde.

In der unteren Spur ist die alkalische Hydrolyse aufgetragen. Man erkennt zum einen noch vollständige RNA (bei 380 Minuten) und bis zum Cy5-Primer abgebaute RNA (bei 140 Minuten).

Bei allen restlichen Ansätzen ist noch vollständige RNA vorhanden. Aus diesem Grund kann man von einem partiellen Verdau sprechen. Die Kontrolle ohne RNase-Behandlung zeigt keinen Peak, die restlichen drei Ansätze zeigen charakteristische Peaks, aus denen man schließen kann, wie die Konformation der RNA an dieser Stelle ist. (siehe Abb. 3-7)

Abbildung 3-7 zeigt eine Vergrößerung des Elektropherogrammes von Abb 3-6. In der Vergrößerung lassen sich verschiedene Bereiche definieren, die einen Rückschluß auf die vorliegende Konformation der RNA zulassen: Vom 3'-Ende hat man zunächst 13 doppelsträngige Nukleotide und einen 10 Nukleotid langen Bereich, in welchem weder RNase T2 noch RNase V1 gespalten haben, dann einen 9 Nukleotid langen einzelsträngigen Bereich und schließlich einen 8 Nukleotid langen doppelsträngigen RNA-Bereich. Es sind demnach ss- und ds-RNA Bereiche erkennbar, eine genauere Analyse der Konformation ist mit dieser Methode nicht möglich, da die Enzyme aufgrund ihrer Größe bei kurzen RNAs nur ungenaue Strukturangaben liefern. Um diese Limitation zu umgehen, wurde durch künstliche Nukleasen eine genauere Kartierung vorgenommen.

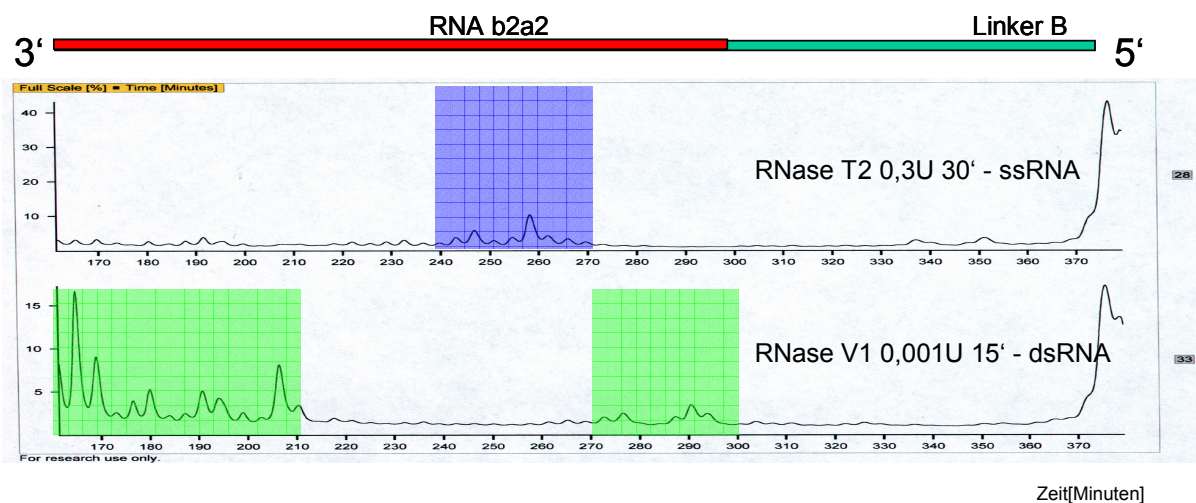


Abb. 3-7. Vergrößert man die Elutionsprofile des RNase T2 und V1 Verdauens von Abb. 3-6, so erkennt man unterschiedliche Bereiche.

Da die RNA durch eine RT-Reaktion in Cy5-Markierte cDNA umgeschrieben wurde, wird die Struktur der RNA hier vom 3'-Ende aufgeklärt. Der 20 nt lange Linker B blieb in der Auswertung unberücksichtigt. Vom 3'-Ende hat man zunächst 13 doppelsträngige Nukleotide, dann einen 10 Nukleotid langen Bereich, in welchem weder RNase T2 noch RNase V1 gespalten haben, dann einen 9 Nukleotid langen einzelsträngigen Bereich und schließlich einen 8 Nukleotid langen doppelsträngigen RNA-Bereich.

Das von Dr. Scheffer durchgeführte Mapping mit einer künstlichen Nuklease, welche spezifisch für einzelsträngige RNA Bereiche ist, liefert das folgende, ein zum RNase-Mapping vergleichbares Elektropherogramm (Abb. 3-8). Durch die bessere Zugänglichkeit des Moleküles im Vergleich zu den RNasen, konnte gezeigt werden, daß das erste Nukleotid am 5'-Ende einzelsträngig vorliegt. Von diesem Punkt ausgehend findet man das folgende Elektropherogramm: 1 nt ss, 7 nt ds, 6 nt ss, 4 nt ds, 7 nt ss, 4 nt ds, 4 nt ss, 6 nt ds und 2 nt ss.

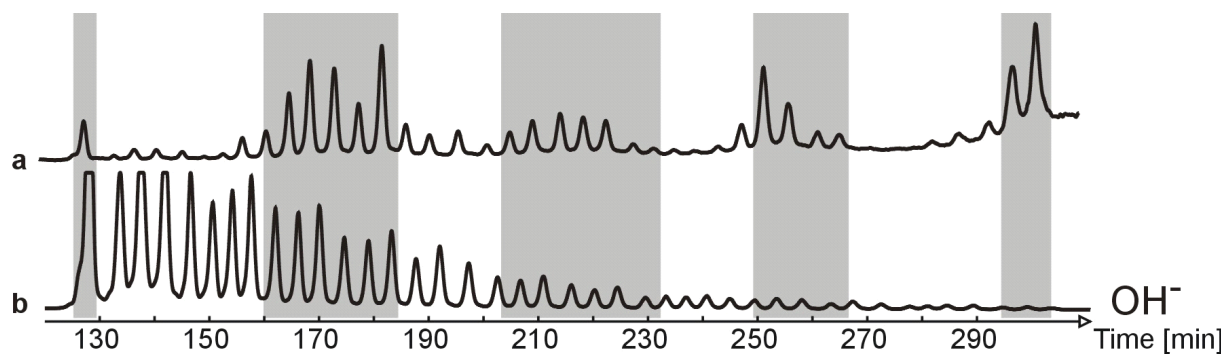


Abb. 3-8. Das von Dr. Scheffer durchgeführte Nukleasemapping (einer chemischen Nuklease, die spezifisch für ssRNA-Bereiche ist), lieferte dieses Elutionsprofil. Es wurde ein Cy5-markiertes DNA-RNA-Hybrid chemisch synthetisiert und nach partiellem Verdau mit dieser Nuklease auf ein Harnstoff-Gel aufgetragen. Spur b ist eine alkalische Hydrolyse und Spur a ist das Elutionsprofil des Mappings. Die folgenden Charakteristika können für die b2a2 RNA festgehalten werden. Vom 5'-Ende: 1 nt ss, 7 nt ds, 6 nt ss, 4 nt ds, 7 nt ss, 4 nt ds, 4 nt ss, 6 nt ds und 2 nt ss. (Die Abb. und Daten wurde freundlicherweise von Dr. Scheffer zur Verfügung gestellt)

Wenn man die Ergebnisse des RNase Mappings mit RNasen, den Verdau mit der künstlichen Nuklease sowie die MFold-Faltung vergleicht, so erkennt man Homologien (siehe Abb. 3-9).

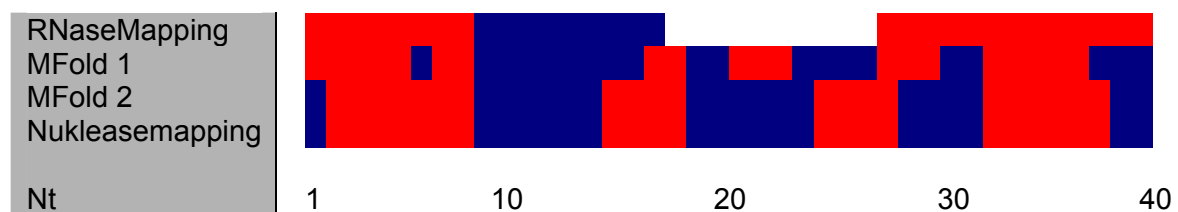


Abb. 3-9. In dieser Abbildung sind die Ergebnisse des RNase-Mappings, des Verdau mit der Nuklease, sowie die MFold Strukturvorhersage für den b2a2-RNA Bruchpunkt zusammengefaßt. Die gesamte Struktur ist 40 nt lang.

Doppelsträngige RNA-Bereiche sind in Rot dargestellt. Einzelsträngige RNA-Bereiche sind in blau dargestellt. MFold liefert zwei unterschiedliche Strukturen für den Bruchpunkt, wobei Faltung 2 thermodynamisch stabiler ist als Faltung 1. Diese Faltung 2 weist hohe Homologien zu dem Nukleasemapping auf. Das RNase-Mapping besitzt eine schlechtere Auflösung als das Ergebnis des Nukleasemappings, steht aber nicht im Widerspruch zu den anderen Ergebnissen.

MFold liefert für den b2a2-RNA Bereich zwei unterschiedliche Strukturen, einer, bei der das erste Nukleotid gepaart ist (siehe Abb. 3-9; MFold 1) und eine bei der das erste Nukleotid ungepaart ist (siehe Abb. 3-9; MFold 2). Anhand des Nukleasemapping ist zu erkennen, daß das erste Nukleotid in ungepaarter Konfiguration vorkommt. Faßt man die Ergebnisse aus den unterschiedlichen Mapping-Experimenten (siehe Abb. 3-9) zusammen, so ergibt sich der folgende Strukturvorschlag für die b2a2 RC10-RNA (siehe Abb. 3.10).

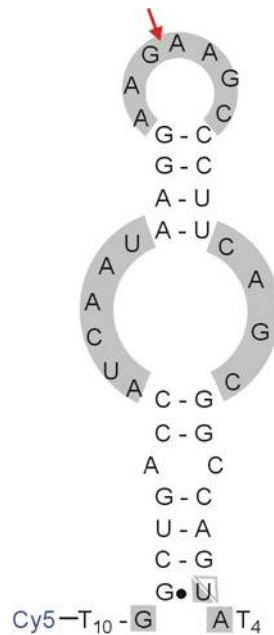


Abb. 3-10. Der Strukturvorschlag für den b2a2-RNA Translokationsbruchpunkt ist hier dargestellt. Der rote Pfeil markiert die Stelle des Bruchpunktes.

Das b2a2 Strukturmodell wird in Abb. 3-10 dargestellt. Der rote Pfeil markiert den b2a2 Translokationsbruchpunkt. Die ersten Nukleotide bis zum Pfeil stammen von der bcr-RNA, die restlichen Nukleotide stammen von der abl-RNA.

Durch die experimentellen Mappingmethoden des b2a2 Bruchpunktbereiches konnte gezeigt werden, daß die Vorhersage von MFold, an diesem Bereich eine Sekundärstruktur zu finden, zutreffend ist. Insofern kann man davon ausgehen, daß auch die anderen durch MFold analysierten Bereiche die Möglichkeit einer Sekundärstrukturfaltung besitzen.

3.2 Kovalente Markierung der RNA-Transkripte am 5'-Ende

Für die verschiedenen RNA-Strukturen sollen spezifisch bindende Peptide gefunden werden. Hierzu wurde das Phage Display System verwendet. Um die RNA während einer Phage Display Selektionsrunde an einer Matrix zu fixieren, ist es notwendig, die RNA mit einer funktionellen Gruppe zu versehen.

Eine Möglichkeit ist die Transkription in Gegenwart von modifiziertem GTP (GMPS) durchzuführen, wodurch eine RNA transkribiert wird, die mit einer Thiolgruppe am 5'-Ende beginnt. An diese SH-Gruppe des verwendeten GMPS kann ein Jodacetamid-Biotin-Linker kovalent verbunden werden, so daß die RNA am 5'-Ende kovalent mit einem Biotin markiert ist.

Die am 5'-Ende markierten RNA-Proben wurden nach PAGE-Reinigung auf ein 3% Agarosegel aufgetragen. Um zu erkennen, wie groß der Anteil an Biotin-markierter RNA ist, wurde jeweils eine Probe mit Streptavidin inkubiert, welches in Verbindung mit der Biotin-GMPS-RNA eine Retardation im Agarosegel verursachen sollte. Inkubation von nicht markierter RNA mit Streptavidin verursacht keinen Shift der RNA.

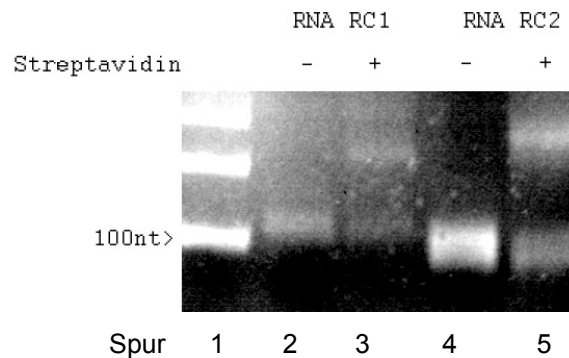


Abb. 3-11. Die RC1 und RC2 RNA wurden am 5'-Ende mit einem Biotin markiert. Die Proben wurden dann ohne (Spur 2 & 4) und mit Streptavidin (Spur 3 & 5) inkubiert und auf das Gel beladen. Man erkennt bei den verwendeten GMPS-RNAs einen Bandshift in Gegenwart von Streptavidin, was darauf hinweist, daß die Markierungsreaktion mit dem Biotin-GMPS erfolgreich verlief.

Die RNA RC1 (Bahnen 2 und 3) und die RNA RC2 (Bahnen 4 und 5) wurden mit dieser Modifikation versehen. Die erste Bahn der jeweiligen RNA ist die Kontrolle ohne Streptavidin, die zweite nach Streptavidininkubation. Links auf dem Gel (Abb. 3-11) ist der Marker „DNA-Smart Ladder“ aufgetragen. Wie bei beiden RNA-Proben erkennbar, ist ein Anteil der RNA retardiert. Daraus kann man folgern, daß diese RNA mit Biotin-GMPS markiert ist. Die Ausbeute ist jedoch zu gering, so daß von dieser Methode Abstand genommen wurde und statt dessen die RNA über ein biotinyliertes Oligonukleotid markiert wurde.

3.2.1 Nichtkovalente Markierung der RNA-Transkripte

Um eine nichtkovalente Markierung der RNA-Sequenzen zu ermöglichen, wurden die jeweiligen RNA Sequenzen nun so erweitert, daß es möglich ist, an das 5'- und 3'- Ende jeweils funktionelle ODN zu hybridisieren. Über ein Biotin-modifiziertes ODN, welches mit dem 5'- Ende hybridisiert ist, wird es möglich, dieses RNA-Hybrid an eine Matrix zu binden und über einen hybridisiertes Chromophor am 3'- Ende die Integrität des Komplexes zu zeigen.

Schematisch ist dies in Abb. 3-12 dargestellt. Die durch In-vitro-Transkription synthetisierte RNA besitzt am 5'- und 3'-Ende unterschiedliche Konsensus-Sequenzen (CSI und II),

welche die Hybridisierung mit dem Linker-Biotin-RC und dem Linker-Fluorescein-RC ermöglichen. Dieses RNA-Konstrukt wird im folgenden als RC und der Strukturnummer bezeichnet.



(Schema: RNA durch IVT)

Abb. 3-12. Dieses Schema zeigt die Struktur der RNA RC-Konstrukte. Der strukturbildende Bereich entspricht demjenigen Bereich, der in der Analyse mit Mfold eine positive Strukturvorhersage lieferte. Die flankierenden unterschiedlichen Konsensus-Sequenzen CSI und CSII dienen zum annealen mit den modifizierten Oligodesoxynukleotiden.

Für ein Phage Display wurde die CSI Sequenz mit einem Linker annealt, welcher Biotin trägt. Dies ermöglicht die Fixierung an eine Matrix während der Waschschrte, CSII dient der Hybridisierung mit einem Farbstoff-ODN. Dadurch kann im Gelretardationsexperiment die Integrität des Komplexes überprüft werden.

Die zugrunde liegenden DNA-Oligonukleotide (Abb. 3-13) besitzen am 5'-Ende noch dem T7-Promotor-Bereich, der als Erkennungssequenz für die T7-RNA-Polymerase dient. Die naszierende RNA entspricht dann dem Komplement des RNA-Oligonukleotides (Abb. 3-12).



(Schema: Annealtes DNA Oligo)

Abb. 3-13. Die hybridisierten DNA-Oligonukleotide für die In-vitro-Transkription hatten den gezeigten Aufbau. Der T7-Promotor-Bereich muß doppelsträngig sein, damit dieser als Promotor von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird. Die beiden Konsensussequenzen und der strukturbildende Bereich wurden transkribiert (siehe auch Abb. 3-12)

Die ODNs hatten die folgende Sequenz.

Name	Sequenz	Verwendungszweck
T7-Promotor	AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GC	T7 Promotor (sense) als Erkennungssequenz für die T7 RNA Polymerase
Linker-Biotin-RC	CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC C Modifikation 3'-Biotin	ODN für die RC-RNAs, um sie am 5'-Ende mit Biotin zu versehen
Linker-Fluorescein-RC	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GT Modifikation 5'Fluorescein	ODN für die RC-RNAs um sie am 3'-Ende mit Fluorescein zu versehen

Tab. 3-2. Diese Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten funktionellen ODNs.

Die folgenden 10 Sequenzen entsprechen dem reverse complement der RNA-Sequenzen, die für die Bildung einer Struktur notwendig sind und waren somit das Template für die In-vitro-Transkription. Zusätzlich dazu sind am 5'- und am 3'- Ende unterschiedliche homologe Sequenzen eingefügt, die es der transkribierten RNA ermöglichen soll, mit dem Biotin- bzw. dem Fluorescein-Linker zu annealen. Schließlich ist am 3'-Ende des nicht codogenen Stranges der reverse komplementäre T7-Promoter eingefügt.

Name	Sequenz
1RC	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTC GCC GCC ACG CTG GCG GGG GGT CCC CGG TCG TCC CGT TCC CCC GAC GCG GCT GCC CCG GGC CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T
2RC	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTT CCA GGT GGC TCA GGT AAG TCT CCT CGC TAG CCA GGA CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T
3RC	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTT GGC GCA GCT TGC GGG CCC CCT CCA CCA GCT CCA CCA CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T
4RC	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTA CGA TGA CAT TCA GAA ACC CAT AGA GCC CCG GAG ACT CAT CAT CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T
5RC	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTT GGA GTT CCA ACG AGC GGC TTC ACT CAG ACC CTG AGG CTC AAA GTC AGA TGC TAC TGG CCG CTG AAG GGC TTT TGA ACT CTC CAT GCT GTC CTA CTG ATT GCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT
6RC	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTG GAC TTG ATG GAG AAC TTG TTG TAG GCC AGG CTC TCG GGT GCA GTC CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T
7RC	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTG GGG CCT GCA GCA AGG TAC TCA CAG CCC CAC CAT GCT GTC CTA CTG ATT GCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT
8RC	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTC AGG AGG CGG AGC AAG AGC GCA GGA AGC GCT TGC TGG AGC TCC ATG CTG TCC TAC TGA TTG CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT
9RC	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTG GCG CGG CCG GCC TTA CCT GCG CCG CCG GGC TGC GCG CGG GGC CCG TCT CAG CGG CGG CGC GGC GGC CTC GCC AGG CCC GGC CCC GGG CGC CGG GCG GCC CCC ATG GCC CCG CGG CCA TGC TGT CCT ACT GAT TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T
10RC	CCA CTG CTA ATT GAG TCT GTG CTA CTG GCC GCT GAA GGG CTT CTT CCT TAT TGA TGG TCA GCC CAT GCT GTC CTA CTG ATT GCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT

Tab. 3-3. Die zehn ODNs wurden mit dem T7-Promotor annealt und dienten bei der In-vitro-Transkription als Template.

Diese modularen RNA-Sequenzen können nun je durch zwei funktionelle ODNs markiert werden. Hier besitzen die RNAs zwei verschiedene Konsensus-Sequenzen am 5'- und 3'-Ende, die jeweils mit einem funktionellen Oligonukleotid annealt werden können. Man erhält somit einen RNA-Komplex, welcher am 5'-Ende der RNA ein Biotin-ODN und am 3'-Ende ein Fluorescein-ODN trägt. Während das Biotin-ODN notwendig für die Fixierung der RNA an eine Matrix während der Selektion ist, kann das Fluorescein dazu verwendet werden, um die Integrität des ODN-RNA-Komplexes nachzuweisen.

Um zu überprüfen, ob die synthetisierten Linker mit Biotin bzw. Fluorescein miteinander interagieren können, wurden diese nach der Durchführung des Annealing Protokolls auf ein 3% Agarosegel aufgetragen. Es wurde mit einer Digitalkamera aufgenommen, um die Farbunterschiede der Oligonukleotide zu erkennen. Fluorescein erscheint dabei grünlich und Ethidiumbromid gefärbte Nukleotide violett.

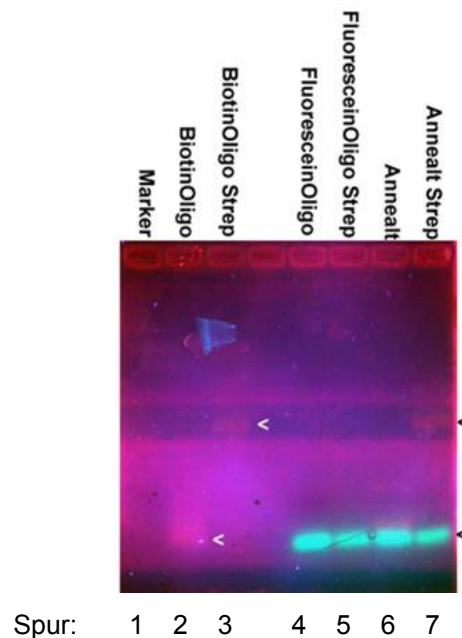


Abb. 3-14. Das 3 % Agarosegel wurde schwach mit Ethidiumbromid gefärbt, damit man sowohl die Ethidiumbromid-, als auch die Fluorescein-Banden erkennen kann. Die 2. Spur zeigt das Biotin ODN ohne und Spur 3 mit Streptavidin.

Hier kann man einen Shift erkennen (weißer Pfeil). Die 4. und 5. Spur zeigt das Fluorescein ODN ohne und mit Streptavidin. Es ist zu erkennen, daß keine Interaktion zwischen dem Streptavidin und dem Fluorescein ODN stattfindet. Bei Spur 6 und 7 wurden die beiden ODNs zusammengegeben und das Annealing-Protokoll wurde durchgeführt. In Spur 6 erkennt man über der Fluorescein-Bande schwach die Ethidiumbromidfärbung des BiotinODNs. In Spur 7 erkennt man einen Shift des BiotinODNs, jedoch nicht des Fluorescein ODNs in Gegenwart von Streptavidin (schwarze Pfeile).

Das Biotin Oligonukleotid zeigt einen Bandshift unter Zugabe von Streptavidin. Das Fluorescein Oligonukleotid läuft auf der Höhe des Biotin-Oligonukleotides, zeigt jedoch keinen Bandshift unter Zugabe von Streptavidin. Werden diese beiden Oligonukleotide nun nach der Durchführung des Annealing-Protokolls auf das Gel aufgetragen, so zeigt sich unter

Zugabe von Streptavidin nur ein Bandshift, der mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden kann. Da kein Shift der Fluorescein-Fluoreszenz zu beobachten war, ist daraus ableitbar, daß die zwei verschiedenen Oligonukleotide nicht miteinander interagieren können.

3.2.2 Integritätsprüfung der 10 Ziel-RNAs

Um zu überprüfen, ob die In-vitro-Transkriptionen der Ziel-RNAs erfolgreich verliefen und sich die RNA-Oligonukleotid-Hybride gebildet haben, wurde eine Integritätsprüfung durchgeführt. Das verwendete Biotin sollte mit Streptavidin einen schwereren Komplex bilden, welcher dazu führt, daß sich die Nukleinsäure langsamer durch das Gel bewegt.

Nach der In-vitro-Transkription der zehn ausgewählten bcr/abl Ziel-Sequenzen und dem Annealen mit dem Biotin-ODN sowie dem Fluorescein-ODN, wurde jeweils eine Probe mit Streptavidin inkubiert, eine andere Probe als Kontrolle nicht. Dieser Bandshift soll zeigen, ob die In-vitro-Transkription erfolgreich verlief und die RNA mit den beiden Oligonukleotiden interagieren kann. Nur in dem Fall, wenn die RNA mit Biotin und Fluorescein markiert ist, kann man bei Inkubation mit Streptavidin einen Bandshift in einem Agarosegel ohne Ethidiumbromid erkennen, wobei hier die Fluoresceinfluoreszenz als Detektionsmarker dient.

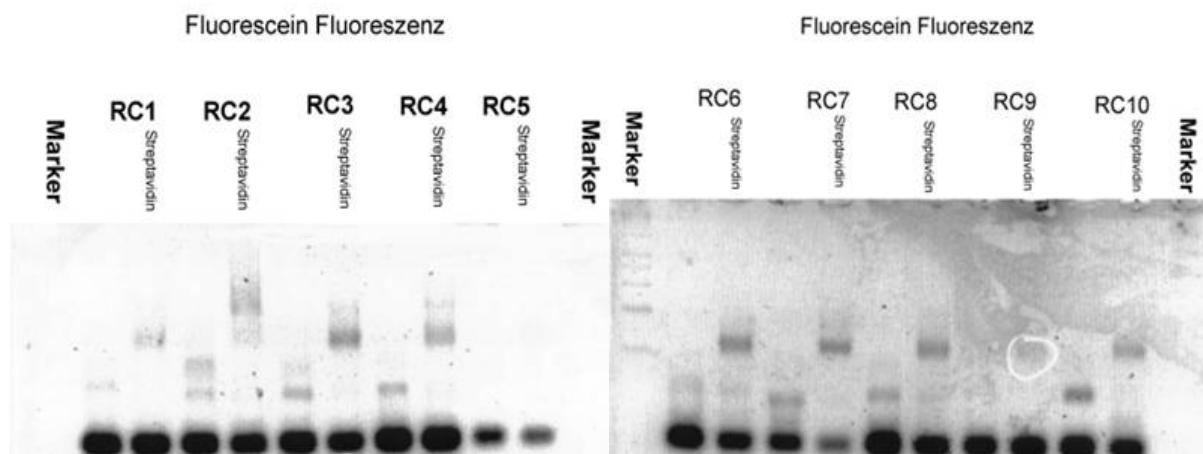


Abb. 3-15. Um die Integrität der RC-RNAs zu überprüfen wurden diese, nachdem sie mit den Biotin und Fluorescein-Linker hybridisiert wurden, auf ein Agarosegel aufgetragen. Hier wurde das Gel nicht mit Ethidiumbromid gefärbt, damit die Fluorescein-Fluoreszenz erkannt werden kann. Falls die Integrität des RNA-Hybrides in Ordnung ist, so kann man mit Streptavidin einen Fluoreszenz-Shift erkennen. Dies ist bei allen zehn RC-Hybriden der Fall.

Diese beiden Bilder (Abb. 3-15) zeigen ein 3 %iges Agarosegel ohne Ethidiumbromid. Man erkennt die starke Fluoreszenz des freien Fluorescein-Linkers (hier schwarz – im Original grünlich) und man erkennt bei den Spuren ohne bzw. mit Streptavidin ebenfalls die fluoresceinmarkierte RNA. In Gegenwart von Streptavidin erkennt man einen Bandshift, der darauf hindeutet, daß sowohl das Biotin- als auch das Fluorescein-ODN an der RNA binden können und das diese Konstrukte intakt sind und in einer Phage Display Selektion verwendet werden können.

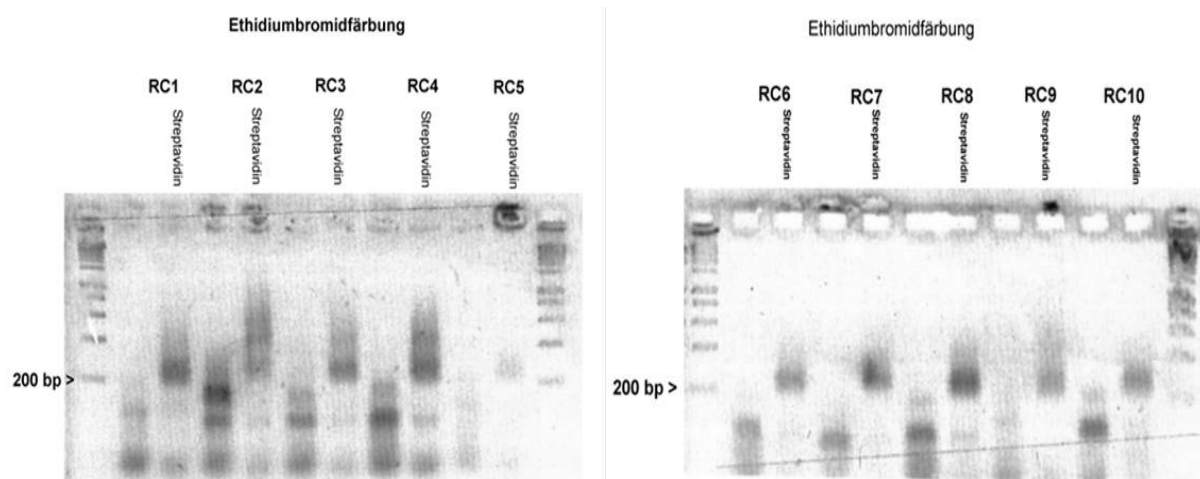


Abb. 3-16. Die Agarosegele, die in von Abb. 3-15 dargestellt sind, wurden mit Etidiumbromid nachgefärbt, um die RNA direkt nachzuweisen. Man erkennt in allen zehn Fällen einen RNA-Shift.

Die beiden Gele wurden dann in einem Ethidiumbromidbad nachgefärbt (Abb. 3-16).

3.3 Phage Display zum Finden von Peptidliganden für die RNA

Nachdem die Integrität der 10 ausgewählten RNAs durch Retardationsexperimente gezeigt worden war, wurde nun begonnen, mit diesen RNAs ein Phage Display durchzuführen.

Mit allen zehn ausgewählten RNA-Bereichen wurde ein Phage Display mit 7mer und 12mer Phagen-Bibliotheken von NEB durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Selektionsmethoden durchgeführt. Bei der ersten Methode wurde das RNA-Hybrid mit den Phagen inkubiert, anschließend an eine magnetische Säule gebunden und nach Waschen die bindenden Phagen eluiert. Diese Phagen wurden amplifiziert und eine weitere Selektionsrunde wurde durchgeführt. Insgesamt wurden drei Positivselektionsrunden durchgeführt. Bei diesen war tRNA als kompetitor RNA im Überschuß vorhanden und die Waschbedingungen wurden mit jedem Schritt stringenter. Anschließend erfolgte eine Negativselektion. Bei dieser Selektion wurde eine nicht-Target RNA-Hybrid als Target

verwendet. Dieses wurde mit den Phagen inkubiert und auf eine Säule gebunden. Hier werden die nicht bindenden Phagen weiter verwendet.

Bei der zweiten Methode wurde in den Selektionsschritt ein kompetitives Element eingefügt, um den Selektionsdruck auf die Phagen zu erhöhen. Bei diesem Schritt wurde nach der Elution von der Säule zu dem Eluat Target-RNA im Überschuß verwendet, welche keine Konsensussequenzen für die Oligonukleotide besitzt und infolgedessen über das Biotin-ODN nicht an eine Säule binden kann. Es stellt sich bei diesem Schritt in Lösung ein neues Gleichgewicht zwischen RNA und kompetitions RNA ein. Dieses Gemisch gibt man nun auf eine zweite Säule und verwendet den Durchfluß weiter.

Nach den Selektionsrunden wurden bei beiden Methoden für jede RNA und für jede Bibliothek 10 einzelne Phagen amplifiziert, die Phagen DNA daraus gewonnen und von dem M13 Promotor ausgehend sequenziert. Hier sollen ähnliche Sequenzen beobachtet werden, die darauf hindeuten, daß diese Sequenzen mit dem jeweiligen RNA-Target in Interaktion treten können.

So exprimierten z.B. 4 von 10 Phagen gegen eine Target die gleiche Aminosäure-Sequenz. Die restlichen Phagen waren entweder Biotin-Bindende Phagen, Streptavidin-bindende Phagen, wt-Phagen, sowie Phagen ohne Übereinstimmung innerhalb der zehn sequenzierten Phagen.

Tab. 3-4 gibt einen Überblick über die gefundenen Aminosäure-Sequenzen, die von diesen Sequenzen bereinigt wurden.

Nummer	Struktur	RNA Ort	Bibliothek	AS-Sequenz	Häufigkeit der Phagen
1	RC1	400-460/bcr	12	SPGSHIPDSPRH	3/10
2	RC2	1518-1554/bcr	12	ALNWSPKLPVPP	2/10
3			12	VATAPLLSLSIG	2/10
4			12	KTFHESSLLHWY	2/10
5	RC3	2144-2181/bcr	7	VHTHFRP	4/10
6	RC5	2776-2856/b3a3	12	ITNQINYLASFH	4/10
7			12	TLPSSFDSWLAN	6/10
8	RC6	3920-3965/abl	7	PRAGTLE	2/10

Nummer	Struktur	RNA-Ort	Bibliothek	AS-Sequenz	Häufigkeit der Phagen
9	RC7	4256-4285/abl	7	ASMISQL	2/10
10			7	SFFNPFI	2/10
11	RC9	5'flk/UTR	7	HIGSFER	5/10
12	RC10	B2a2	7	KHLHLHK	6/10

Tab. 3-4. Diese Tabelle faßt die gefundenen Peptidsequenzen nach erfolgter Selektion zusammen. Gegen alle RC-Strukturen, außer gegen RC4 und RC8, konnten Peptidsequenzen isoliert werden, die häufiger als andere vorkommen. Für jede RNA Struktur wurden 10 unterschiedlichen Phagen sequenziert. Die Häufigkeit des Vorkommens der Peptidsequenz ist in der rechten Spalte angegeben.

Für alle RNA-Targets außer für RC4 und RC8 konnten Peptidsequenzen gefunden werden. Um den Selektionsdruck auf die Phagen während eines Screening Prozesses zu erhöhen, wurde dieser durch ein Wettbewerbsschritt erweitert. Als Ziel-RNA wurde Struktur RC10 ausgewählt, die als Translokationsbereich ein interessantes Target ist. Als Phagen Bibliothek wurde die 12er Library ausgewählt. Im Gegensatz zu der 7er Library haben die 12 AS langen Peptide mehr Freiheitsgrade und somit die Möglichkeit sich stärker zu strukturieren.

Nach dem Selektionsprozeß wurden 10 Phagen sequenziert. Auch hier konnte keine Konsensus-Sequenz ermittelt werden, sondern nur identische Klone gefunden werden. Es wurden dann jedoch mit allen Sequenzen, die in diesem kompetitions Screening gefunden, weitergearbeitet. Sieben Sequenzen waren Phagen ohne das Insert, zwei kodierte für die AS Sequenz TLPSSFNSWLAR eine weitere Sequenz kodierte die AS Sequenz NPEKVKMLYVEF (siehe Tab. 3-5).

Nummer	Struktur	RNA Ort	Bibliothek	AS-Sequenz	Häufigkeit der Phagen
13	RC10	B2a2	12	TLPSSFNSWLAR	2/10
14			12	NPEKVKMLYVEF	1/10

Tab. 3-5. Nach der kompetitiven Selektion mit der Ziel-RNA RC10, wurden die beiden folgenden Peptidsequenzen ermittelt. Insgesamt wurden also 14 verschiedene Peptidsequenzen gefunden, welche 10 unterschiedliche RNA Targets binden sollten (Siehe auch Tab. 3-4).

3.4 Fluoreszenz Korrelations- Spektroskopie zum Nachweis der Phagen-RNA Interaktion

Nachdem die Struktur am b2a2 Bruchpunkt charakterisiert ist und durch Biopanning Peptidsequenzen gefunden wurden, welche die Möglichkeit besitzen die unterschiedlichen RNA Strukturen zu binden, folgt nun eine biophysikalische Charakterisierung der möglichen Interaktion.

Fluoreszenz Korrelation Spektroskopie wurde verwendet, um die Interaktion von den selektionierten Phagen mit der RNA zu ermitteln. Gemessen werden Diffusionsgeschwindigkeiten in Lösung, wobei man mit dem ConFoCorII maximal drei unterschiedliche Geschwindigkeiten simultan messen kann. Eine Messung beinhaltet verschiedene Schritte, die nun im folgenden exemplarisch beschrieben werden.

Die Cy5-gelabelte b2a2-RNA wurde mit dem Phagen 12 (KHLHLHK) inkubiert und als Probe aufbereitet. Nach der Kalibrierung des ConFoCorII auf das verwendete Chromophor, wird die Probe vermessen und die Count Rate ermittelt. Befindet sich das Chromophor im konfokalen Volumen, emittiert es die detektierbaren Photonen. Die Messung der Count Rate von Cy5-markierter RNA und den spezifischen Phagen wird in Abb. 3-17 dargestellt.

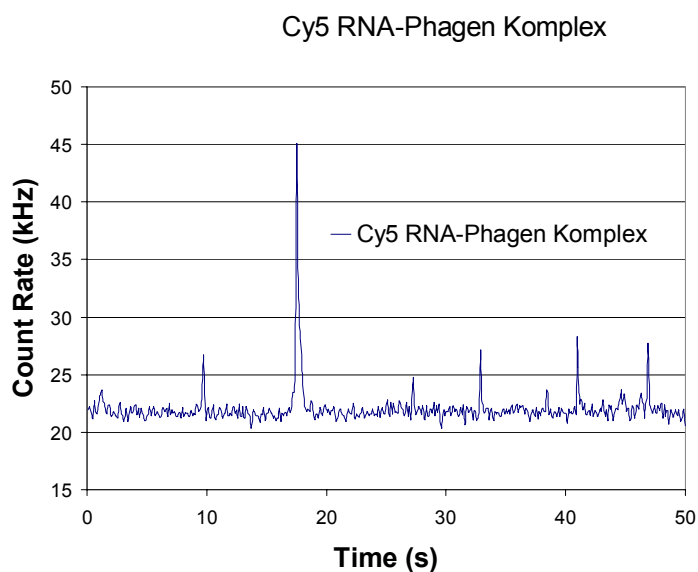


Abb. 3-17. Diese Darstellung zeigt, wie sich die Count Rate verhält, wenn der Cy5 RNA Phagen-Komplex vermessen wird.

Im nächsten Schritt wird die Korrelationsfunktion G ermittelt. Die gemessene Fluoreszenz Fluktuation – in Form der Count Rate - wird mit der Autokorrelationsfunktion analysiert. Hierbei wird die Veränderung der Intensität mit der Zeit ermittelt, indem zu jedem Zeitpunkt t die Fluoreszenzintensität zu einem kurzen Zeitmoment später $t+\tau$ korreliert wird. Das

Ergebnis ist die Korrelationsfunktion, wobei man aus dem Verlauf der Kurve schon ungefähre Diffusionszeiten und die Anzahl der Populationen ermitteln kann.

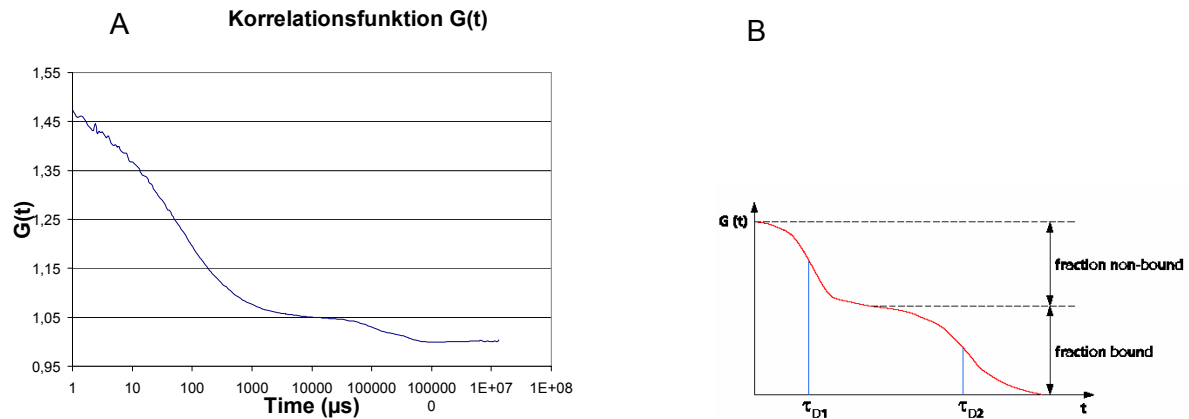


Abb. 3-18. Aus der Count Rate (siehe Abb. 3-16) wird die Korrelationsfunktion ermittelt. Unter „B“ ist der schematische Verlauf einer solchen Funktion dargestellt. Anhand des Verlaufs der Kurve kann abgeschätzt werden, wie viele Fraktionen vorhanden sind und auch welche Diffusionszeiten die Fraktionen besitzen. Unter „A“ ist die Korrelationsfunktion des Cy5-RNA-Phagen-Komplex dargestellt. Erkennbar sind unterschiedliche Fraktionen, von denen die gebundene Fraktion eine Diffusionszeit von etwa 200.000 μs besitzt.

Im letzten Arbeitsschritt wird die Korrelationsfunktion an das biophysikalische Modell der Diffusion angepaßt. Je nach Zahl der fluoreszenzaktiven Komponenten, kann man verschiedene Modelle mit der Zahl der Komponenten 1 bis 3 betrachten. In unserem Fall haben wir es mit einem 3-Komponenten-System zu tun. Dem Cy5-linker, der Cy5-markierten RNA und dem Komplex aus der Cy5-RNA mit dem Phagen. Mit dieser Annahme sollte nur das Biophysikalische Modell für $n=3$ eine gute Anpassung an die Korrelationsfunktion geben. In der Abb. 3-19 wird gezeigt, daß man für $n=1$ bzw. 2 nur unzureichende Anpassungen erhält, während die Anpassung mit $n=3$ gute Werte liefert.

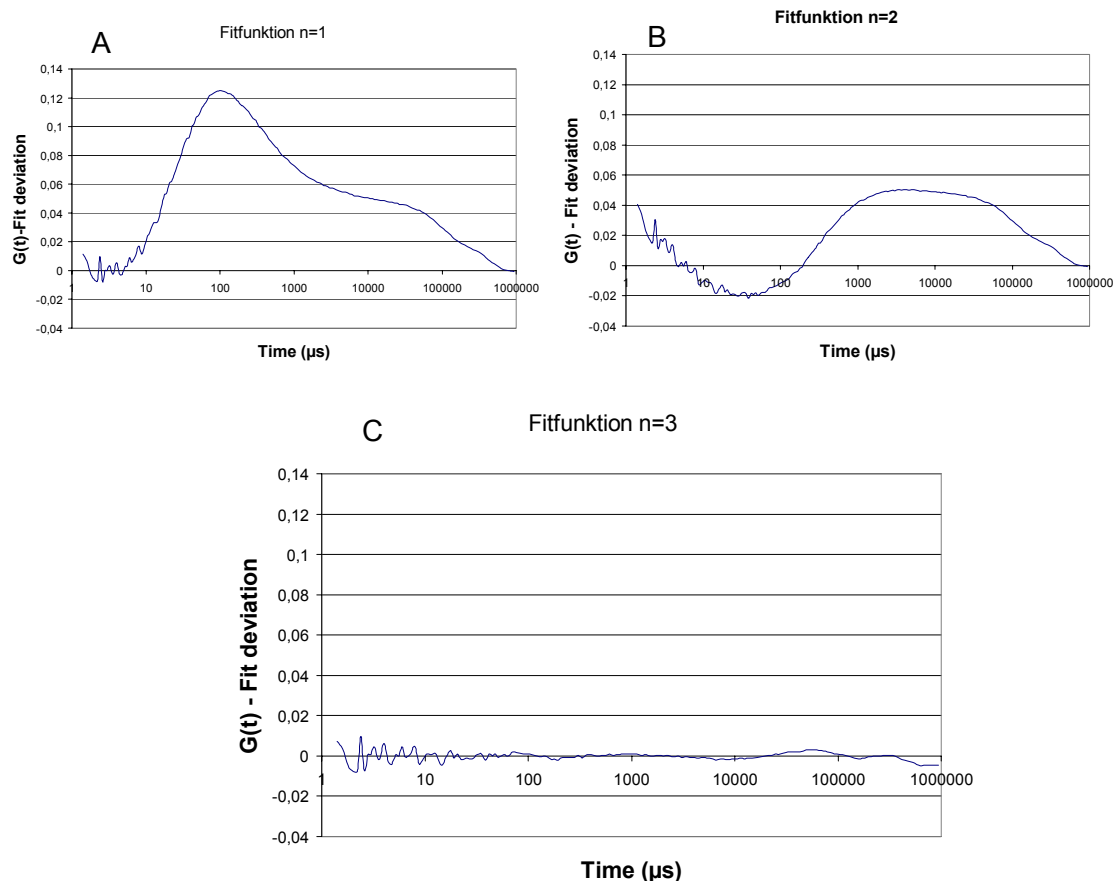


Abb. 3-19. Die Korrelationsfunktion (siehe Abb. 3-17) wird dann an das vorliegende biophysikalische Modell angepaßt. In unserem Fall sind theoretisch drei verschiedene Populationen in der Lösung: 1. der freie Cy5-Linker; 2. der Cy5-Linker hybridisiert an die RNA sowie 3. der Linker und die RNA im Komplex mit den Phagen. Sieht man sich die Abweichungen der Fitfunktion von der Korrelationsfunktion an, so ist ersichtlich, daß der Fit mit 3 Fraktionen („C“) die besten Ergebnisse liefert und somit das theoretische Modell unterstützt.

Nach diesen Ergebnissen ist es möglich, die RNA-Phagen Interaktion im FCS zu erkennen und auszuwerten.

Alle RNA Targets, für die im Phage Display häufiger vorkommende identische Sequenzen gefunden wurden, wurden im ConFoCorII vermessen. Zunächst wurde auf den hier verwendeten Farbstoff Rhodamin6G kalibriert, dann die Diffusionszeiten der R6G markierten RNA ermittelt. Hierzu ist ein zweikomponenten Fit notwendig, da neben der markierten RNA noch freier R6G-Linker vorhanden ist. Nun wurden zu jeder RNA die gereinigten Phagen gegeben, die an die jeweiligen RNA binden sollen. Wenn eine Phagen-RNA-Interaktion stattfindet, so ist dies an einer langsamen Diffusionszeit zu erkennen, die durch die Masse des Phagen (etwa 5MDa) hervorgerufen wird. Unter den gemessenen Bedingungen konnte eine Interaktion bei den Phagen 12 und 14 mit dem RNA Target Nummer 10, dem b2a2 Translokationsbereich, nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-20).

Durch diese Art der Messung tätigt man eine Vorauswahl der Phagen-RNA Interaktion, da hier einige Limitationen gelten. Die Konzentration des Chromophores darf nicht zu hoch sein,

da man bei dieser Art von Messung auf die Fluoreszenzfluktuation angewiesen ist. Ist die Konzentration des Chromophores zu hoch, so kann der Detektor nicht mehr messen und aus den Daten keine Diffusionszeit ermittelt werden. Die Konzentration des Chromophoren war hier im nanomolaren Bereich.

Um einen Phagen-RNA-Komplex zu erkennen, wurde, bedingt durch die langsame Diffusionszeit des Phagen, die Meßzeit verlängert. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß ein Phagen-RNA-Komplex durch das konvokale Volumen diffundiert und dadurch auswertbar wird. Auch werden hier nur Phagen-RNA Interaktionen gemessen, die den niedrigsten kD-Wert der eingesetzten Phagen besitzen. Phagen-RNA Interaktionen mit einem höheren kD-Wert sind zu selten, als daß diese ein auswertbares Signal im FCS liefern.

FCS 10 RNA targets und selektionierte Phagen

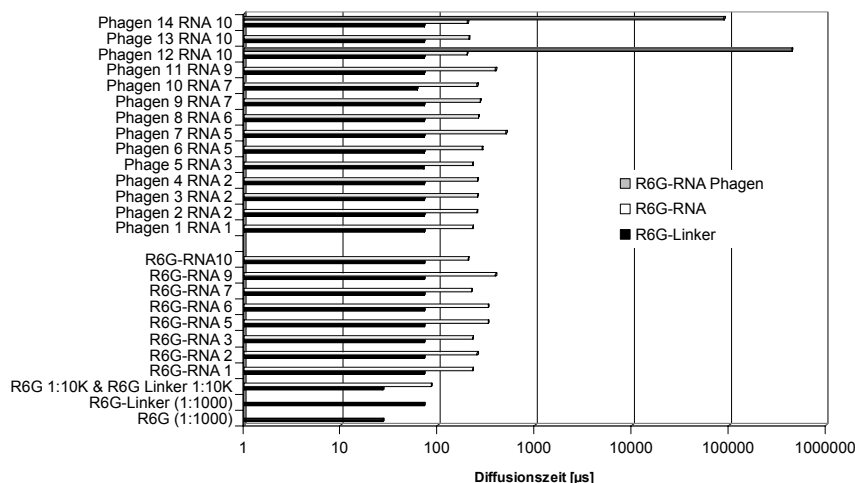


Abb. 3-20. Alle im Phage-Display selektierten Phagen wurden im FCS auf mögliche RNA-Interaktion überprüft. Gezeigt werden hier die Diffusionszeiten der unterschiedlichen Experimente. Nachdem das ConFoCor auf den Farbstoff geeicht war, wurden zunächst die Diffusionszeiten des Linkers und der Linker-RNA Hybrides ermittelt. Anschließend wurden diejenigen Ansätze vermessen, bei denen das markierte RNA-Ziel mit dem entsprechenden Phagen inkubiert wurde. Alle 14 Phagen wurden mit dem jeweiligen RNA-Target vermessen. Nur bei Phage 12 und Phage 14 konnte eine langsame Diffusionszeit ermittelt werden, die darauf hindeutet, daß die Phagen mit der RNA interagieren und mit ihrer Masse die Diffusionszeit entsprechend verlangsamen.

Ob es sich bei der gemessenen Interaktion zwischen Phage 12 bzw. 14 und der RNA 10 um eine spezifische Interaktion handelt, wurden zunächst die Phagen gegen unspezifische Phagen ausgetauscht, dann die RC10-RNA gegen eine RNA (RNA, welche ein anderes

Target für die Selektion war z.B. RNA RC3), die in etwa die gleiche Länge besitzt und auch die Möglichkeit hat, Strukturen zu formen.

Wie in Abbildung 3-21 zu erkennen ist, kann eine langsame Diffusionszeit nur bei den Phagen 12 und 14 mit der RNA RC10 nachgewiesen werden. Werden die Phagen gegen unspezifische Phagen getauscht kann dieser Komplex ebenso wie bei einem Tausch der RC10 RNA mit einer unspezifischen RNA nicht mehr detektiert werden.

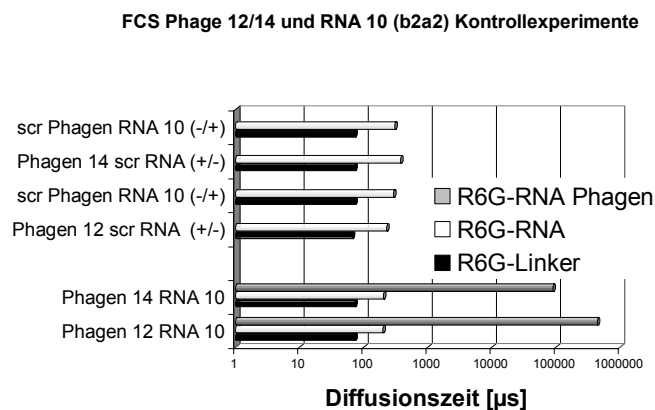


Abb. 3-21. Um zu überprüfen, ob die Interaktion der Phagen 12 und 14 mit der RNA RC10 (der b2a2-RNA) spezifisch ist, wurden die spezifischen Phagen mit nicht-target RNA, bzw. die spezifische RNA mit nicht-target Phagen inkubiert. Die dritte Fraktion mit einer Diffusionszeit um 100.000 µs, die auf eine RNA-Phagen-Interaktion hinweist, konnte nur bei den Ansätzen gemessen werden, wo die Target RNA mit den Phagen vorhanden war (die beiden unteren Säulen). Tauscht man die RNA oder den Phagen aus (die vier oberen Säulen), so kann diese langsame Diffusionszeit nicht mehr ermittelt werden. (-/+ : unspezifische Phagen und RC10 RNA; +/- : selektierter Phage 12 oder 14 und unspezifische RNA; scr.: unspezifischer Phage oder RNA)

Neben den Diffusionszeiten kann aus den Meßwerten auch der Anteil der jeweiligen Population errechnet werden. Aus diesem Grund kann man mit dem Gerät unter kompetitiven Bedingungen messen. Mit dieser Art der Messung wird die Spezifität der Interaktion ermittelt. Hierbei geht es darum die Gleichgewichte unter Zugabe eines Kompetitors zu verändern. Wenn man sich die Interaktion des Phagen mit der R6G-markierten RNA betrachtet, so gibt es verschiedene Möglichkeiten, diesen Komplex zu kompetieren. Zum einen kann man mit einem Überschuß an spezifischer RNA, bei der die Bindesequenz für den Chromophoren-Linker fehlt, den Phagen-R6G-RNA-Komplex kompetieren. Zum anderen ist es möglich mit einem Überschuß an synthetisiertem Peptid, das verantwortlich für die Interaktion ist, ebenfalls in diesem Komplex zu kompetieren.

In beiden Fällen entstehen Komplexe, die im FCS nicht mehr nachgewiesen werden können. Im Fall der Kompetition mit dem Peptid ist der Masseunterschied zwischen freier RNA und freier RNA mit gebundenem Peptid zu gering um eine Veränderung der Diffusionszeit

hervorzurufen, die im ConFoCorII unterschieden werden kann. Im Fall der Konkurrenz mit der RNA besitzt diese kompetitor RNA keine Möglichkeit mit dem chromophoren ODN zu interagieren, wobei dies eine Grundvoraussetzung ist, um im FCS zu messen.

Sowohl der Phage 12 also auch der Phage 14 wurden kompetitiv im FCS vermessen. Da man durch FCS auch die Anteile der jeweiligen Populationen errechnen kann, wurden verschiedene kompetitions Experimente durchgeführt, welche nicht die Diffusionszeit ändern sollten, sondern vielmehr die jeweiligen Anteile der Populationen.

Zunächst wurden die Diffusionszeiten des R6G-Linker, der R6G-markierten RNA und des RNA-Phagen-Komplexes ermittelt (siehe Abb. 3-22). Es ist zu erkennen, daß sich diese Diffusionszeiten unter kompetitiven und nicht kompetitiven Bedingungen nicht unterscheiden. Das gleiche Resultat erhält man bei der Konkurrenz mit dem synthetisierten Peptid.

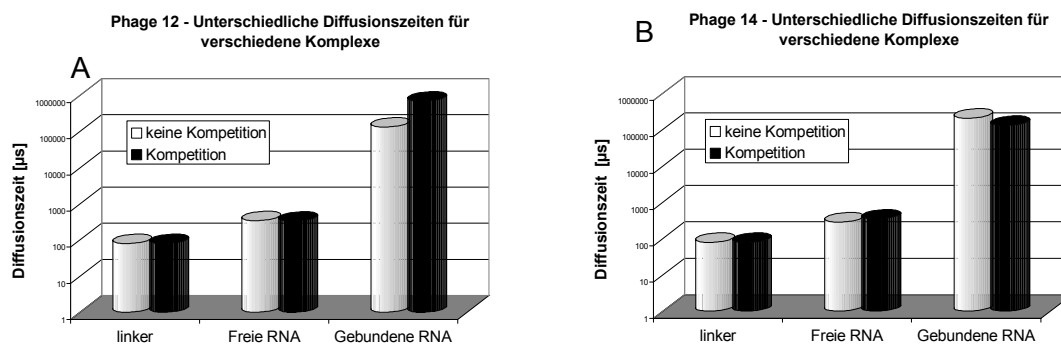


Abb. 3-22. Zunächst wurde die Diffusionszeit der unterschiedlichen Fraktion unter kompetitiven und nicht-kompetitiven Meßbedingungen ermittelt. Dargestellt sind hier die Diffusionszeiten bei Konkurrenz mit kompetitor RNA bei Peptid 12 („A“) und Peptid 14 („B“) (Die Diffusionszeiten bei der Konkurrenz mit synthetisiertem Peptid waren vergleichbar).

Die Diffusionszeit des Linkers liegt im Bereich um 80 μs , die der RNA um 350 μs und der RNA-Phagen Komplex besitzt eine Diffusionszeit um 100.000 μs .

Zunächst wurden die Anteile ermittelt, die bei der Konkurrenz mit kompetitor RNA entstehen. Das Schema (siehe Abb. 3-23) verdeutlicht die Veränderung des Gleichgewichtes unter Zugabe von einem Überschuß an kompetitor RNA. Die Chromophoren-RNA interagiert mit den Phagen und bildet somit einen Komplex. Durch Zugabe von kompetitor RNA wird nun die im FCS sichtbare RNA gegen die nicht nachweisbare RNA getauscht und es kommt zu einer Abnahme der Phagen-RNA-Komplexe, die im FCS beobachtet werden können.

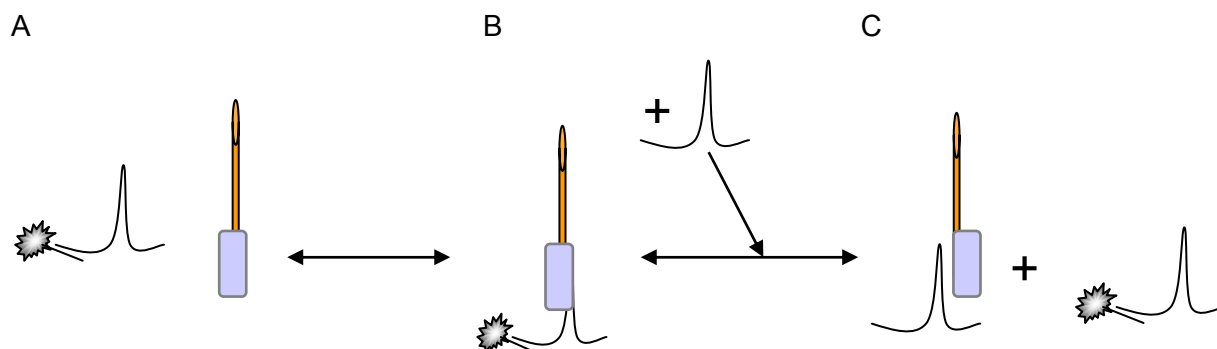


Abb. 3-23. Eine schematische Darstellung der veränderten Gleichgewichtseinstellungen unter Konkurrenz mit kompetitor RNA. Die markierte RNA interagiert mit dem Phagen(A) und bildet einen Chromophoren-RNA-Phagen Komplex aus, der im FCS nachgewiesen werden kann(B). Gibt man nun hierzu im Überschuß kompetitor RNA, d. h. RNA mit der gleichen Struktur wie die Target RNA, aber ohne den Chromophoren-Hybridisierungs-Linker dazu, so stellt sich ein neues Gleichgewicht ein(C). Die kompetitor RNA verdrängt die Markierte-RNA von dem Phagen, so daß der Komplex aus kompetitor-RNA und Phagen wegen des fehlenden Farbstoffes für das FCS nicht mehr detektierbar wird. Gleichzeitig erhöht sich der Anteil an freier Markierter-RNA.

Phage	Linker %		Freie RNA %		Gebundene RNA %	
	Keine Kompetitor	RNA Konkurrenz	Keine Kompetitor	RNA Konkurrenz	Keine Kompetitor	RNA Konkurrenz
12	51	54	13	34	34	16
14	39	34	19	42	41	23

Tab. 3-6. In dieser Tabelle sind die Anteile der unterschiedlichen Fraktionen unter Konkurrenz mit kompetitor RNA dargestellt (siehe auch Abb. 3-23 und Abb. 3-24). Während sich die Anteile des Linkers nicht verändern, so erkennt man eine Veränderung bei der freien RNA und dem RNA-Phagen-Komplex. Unter kompetitiven Bedingungen nimmt der Anteil an freier detektierbarer RNA zu, während die Anteile des Komplexes abnehmen. In der Abb. 3-24 wird dieses Verhalten als Diagramm dargestellt.

Mißt man kompetitiv, so erhält man das folgende Ergebnis (Tab. 3-6 Abb. 3-24). Der prozentuale Anteil des Linkers ist unter nicht kompetitiven bzw. kompetitiven Bedingungen bei beiden verwendeten Phagen nahezu identisch.

Der Anteil der freien RNA unter Verwendung des Phagen 12 nimmt unter kompetitiven Bedingungen von 13 % auf 34 % zu, während der Anteil der gebundenen RNA von 34 % auf 16 % abnimmt. Unter Verwendung des Phagen 14 zeigt sich ein ähnliches Bild: die Zunahme der freien RNA und die Abnahme der gebundenen RNA unter kompetitiven Bedingungen im Vergleich zu den nicht kompetitiven Bedingungen.

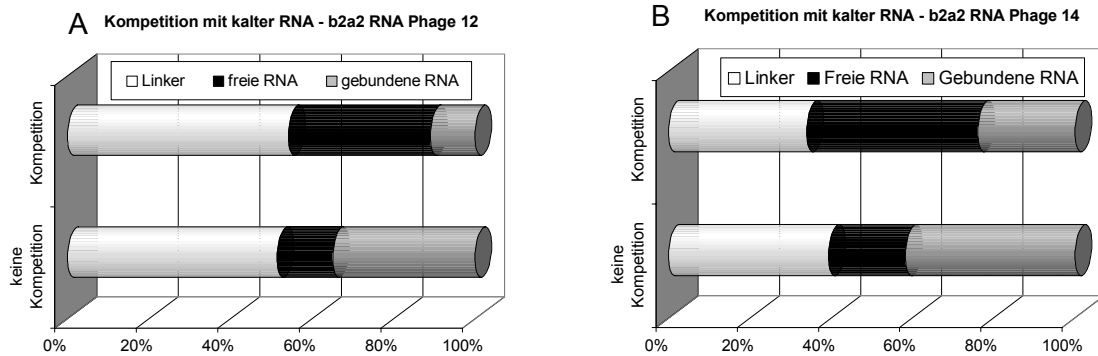


Abb. 3-24. Das Diagramm unter „A“ zeigt die Anteile der unterschiedlichen Fraktion bei Kompetition mit kompetitor RNA in Gegenwart von Phage 12. Es ist zu erkennen, daß der Anteil an freier RNA zunimmt und der Anteil an gebundener RNA unter kompetitiven Bedingungen im Vergleich zur nicht-Kompetition abnimmt. Das Diagramm unter „B“ zeigt die Kompetition mit kompetitor RNA in Gegenwart von Phage 14.

Anschließend wurde Kompetitiv mit einem Überschuß an synthetisiertem Peptid gemessen. Die AS-Sequenz des Peptids entspricht dabei jeweils der selektionierten Phagen-Peptid-Sequenz. Hier wurde der Phagen aus dem RNA-Phagen-Komplex durch das spezifische Peptid von der RNA verdrängt. Die Diffusionsparameter des dabei entstehenden RNA-Peptid-Komplexes konnten im FCS nicht von denjenigen der freien RNA unterschieden werden, so daß dieser Komplex dann zu den Anteilen der freien RNA hinzugerechnet wurde.

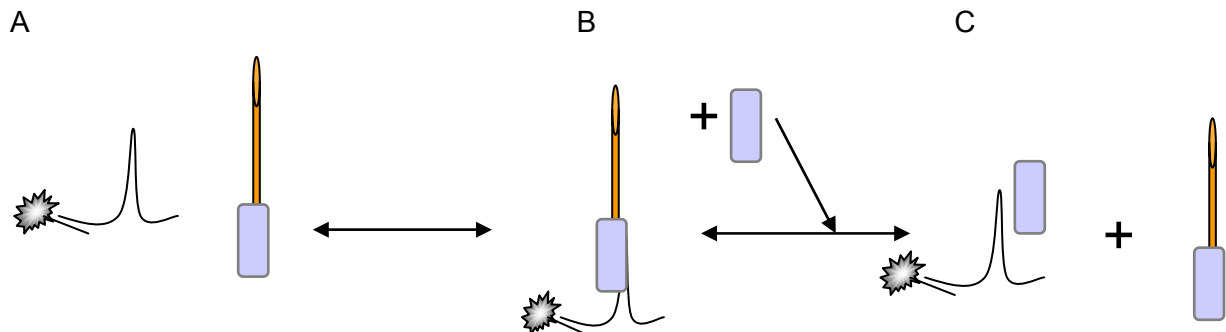


Abb. 3-25. Das Schema beschreibt die Neueinstellung des Gleichgewichtes bei Verwendung von synthetisiertem Peptid. Zunächst interagiert die Markierte-RNA mit dem Phagen (A) und bildet einen Komplex aus (B). Dieser Komplex kann durch Zugabe eines Überschusses an synthetisiertem Peptid verändert werden (C). Das synthetisierte Peptid entspricht dabei der Peptidsequenz des Peptides, welches von dem Phagen präsentiert wird. Sollte das Peptid mit der RNA interagieren können, so wird der Phage von der RNA verdrängt. Dadurch verringert sich der Anteil an RNA-Phagen-Komplexen.

Da die Diffusionsgeschwindigkeit abhängig von der Masse ist und die Masse zwischen freier Markierter-RNA und Markierter-RNA im Komplex mit dem synthetisierten Peptid annähernd gleich ist, können diese beiden Populationen durch das FCS nicht unterschieden werden.

Peptid	Linker %		Freie RNA %		Gebundene RNA %	
	Keine Kompetitor	Peptid Kompetition	Keine Kompetitor	Peptid Kompetition	Keine Kompetitor	Peptid Kompetition
12	32	35	41	58	26	6
14	43	43	22	39	34	16

Tab. 3-7. In dieser Tabelle sind die Anteile der unterschiedlichen Fraktionen unter Competition mit synthetisiertem Peptid dargestellt (siehe Abb. 3-25 und Abb. 3-26). Während sich die Anteile des Linkers kaum verändern, erkennt man eine Veränderung bei der freien RNA und dem Phagen-RNA-Komplex. Unter kompetitiven Bedingungen nimmt der Anteil an freier detektierbarer RNA zu, während die Anteile des Komplexes abnehmen. Dieses Verhalten wird in Abb. 3-26 als Diagramm dargestellt. Hier ist auch der erste Hinweis, daß das Peptid mit der RNA interagieren kann.

Die Ergebnisse der Competition mit dem Peptid werden in Tab. 3-7 und in Abb. 3-26 dargestellt. Die prozentualen Anteile des Linkers sind auch hier bei den kompetitiven und nicht kompetitiven Experimenten nahezu identisch. Der Anteil der freien RNA nimmt unter kompetitiven Bedingungen von 41 % auf 58 % zu, während der Anteil der Phagen gebundenen RNA von 26 % auf 6 % zurückgeht. Dies verhält sich ähnlich wie bei Peptid und Phage 14.

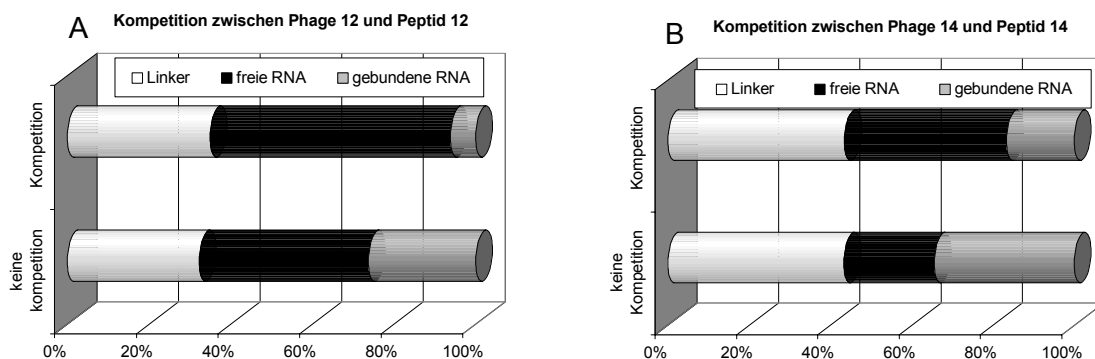


Abb. 3-26. Das Diagramm unter „A“ zeigt die Anteile der unterschiedlichen Fraktion bei Competition mit synthetisiertem Peptid in Gegenwart von Phage 12. Es ist erkennbar, daß der Anteil an freier RNA zunimmt und der Anteil an gebundener RNA unter kompetitiven Bedingungen im Vergleich zur nicht-Kompetition abnimmt. Das Diagramm unter „B“ zeigt die Competition mit synthetisiertem Peptid in Gegenwart von Phage 14.

Es konnte durch FCS gezeigt werden, daß zwei Phagenpopulationen, die durch das Phage Display gewonnen wurden, spezifisch an RNA Target 10, dem b2a2 Bruchpunkt binden können. In kompetitiven Messungen wurde sowohl mit kompetitor RNA als auch mit synthetisiertem Peptid der Phage verdrängt. In beiden Fällen konnte man eine Abnahme des RNA-Phagen-Komplexes erkennen, die einhergeht mit einer Zunahme an freier markierter RNA.

3.5 Circular Dichroitische Messungen zur Beschreibung der Peptid-RNA Interaktion

Das Phänomen der optischen Aktivität kann man sich zunutze machen, um die Strukturen von Protein bzw. konformationelle Änderungen an Nukleinsäuren zu beschreiben. Bei der verwendeten circular dichroitischen Methode wird die Eliptizität einer Probe im UV-Licht vermessen. Kommt es bei der Interaktion der RNA mit einem Interaktionspartner zu einer konformationellen Veränderung der RNA, so kann diese Veränderung im CD-Experiment an einer veränderten Eliptizität erkannt werden. In dem Bereich unterhalb von 240 nm erkennt man Veränderungen, welches das Protein betrifft.

Wurden die synthetisierten Peptide 12 und 14 ([120] μ M resp. [140] μ M) im CD-vermessen, so zeigten diese keine Veränderung der Eliptizität oberhalb von 250 nm (siehe Abb. 3-27). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, daß die Veränderung der Eliptizität oberhalb von 250 nm auf eine Veränderung der Struktur der Nukleinsäure zurückzuführen ist.

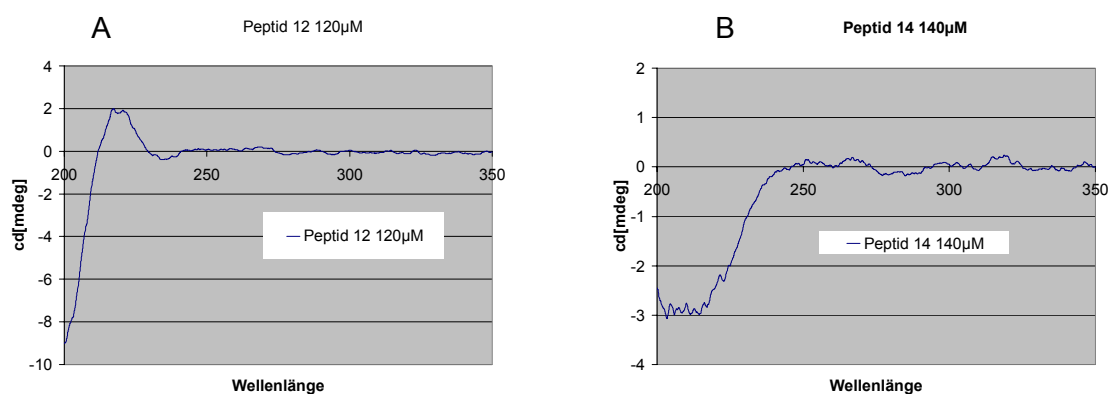


Abb. 3-27. Die verwendeten Peptide 12 (A) und 14 (B) wurden bei einer Konzentration von 120 bzw. 140 μ M CD-Spektrometrisch vermessen. Sie zeigen eine optische Aktivität unterhalb von 250 nm. Oberhalb von 250 nm kann keine Veränderung der Eliptizität gemessen werden.

Im Gegensatz zu Peptiden, findet die optische Aktivität der Nukleinsäuren im Bereich zwischen 250-275 nm statt. Der Effekt beruht hier auf den elektronischen Übergängen zwischen den Nukleotidbasen. Je nach Konformation der einzelnen Basen verändert sich die Intensität der Übergänge und ist somit eine Funktion der Sekundärstruktur der Nukleinsäure. Im folgenden Experiment wurden 1 μ M b2a2-RNA vorgelegt und nach Zugabe von je 12 μ M Peptid 12 bis zu einer Endkonzentration von 84 μ M jeweils ein CD-Spektrum aufgenommen. Die übereinandergelegten CD-Spektren bei verschiedenen Peptidkonzentrationen werden in Abb. 3-28 dargestellt. Die Veränderung der Eliptizität zwischen 200 bis 250 nm ist auf das

Peptid zurückzuführen, während die Veränderung der Eliptizität zwischen 250 bis 300 nm auf eine strukturelle Änderung der RNA infolge der Peptid-Interaktion zurückzuführen ist. Von dem Maximum der Meßpunkte ausgehend, werden die gemessenen Werte $(\theta_{\max}-\theta)/(\theta_{\max}-\theta_{\min})$ gegen die Peptidkonzentration aufgetragen.

Falls eine Peptid-RNA-Interaktion stattgefunden hat, sollte man zwei Populationen erkennen, welche gleichbedeutend sind mit 100 % nicht Bindung und 100 % Bindung. Aus dem Wendepunkt einer solch sigmoidalen Funktion kann der kD-Wert abgeleitet werden. Die aufgetragenen Werte wurden mit der Boltzmann-Funktion asymptotisch transformiert ($y = (A1-A2)/(1+e^{(x-x_0)/dx}) + A2$; Wobei A1 der Wert ohne Peptid und A2 der Wert mit einem Überschuß an Peptid bedeutet).

Aus den Daten ist zum einen zu erkennen, daß das Peptid 12 mit der RNA interagiert und zum anderen, daß der kD-Wert im Bereich um 42 μM +/- 10% liegt. Der Verlauf der transformierten Funktion zeigt eine negative Steigung am Wendepunkt. Man erkennt hier im Vergleich mit den Meßdaten von Peptid 14 (siehe Abb. 3-29), daß die Bindung eine andere ist und die Konformation der RNA unterschiedlich beeinflusst.

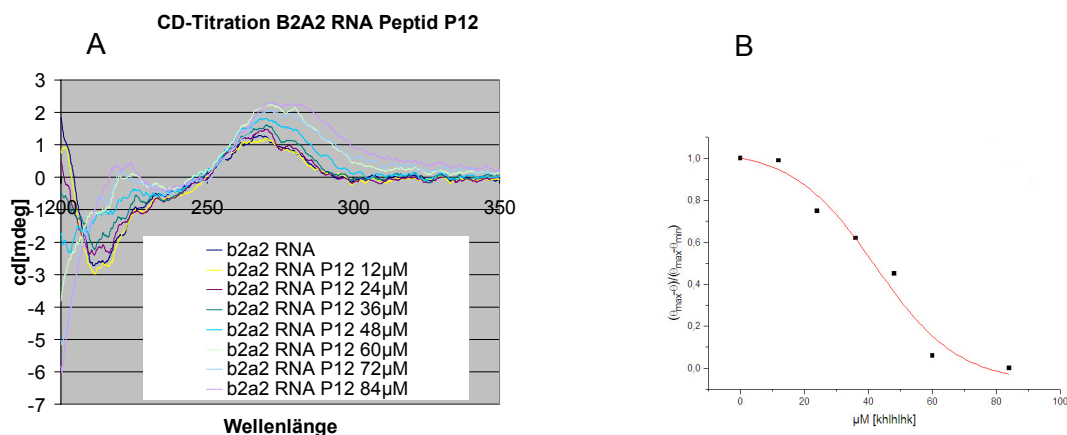


Abb. 3-28. Titriert man zu der b2a2-RNA das synthetisierte Peptid 12 und nimmt CD-Spektren auf, so beobachtet man oberhalb von 250 nm eine Veränderung der Eliptizität (A). Diese Änderung hat die Ursache in der Interaktion des Peptides mit der RNA zur Folge, wobei diese ihre Konformation ändert.

Abbildung B) zeigt eine Auftragung von $(\theta_{\max}-\theta)/(\theta_{\max}-\theta_{\min})$ gegen die Peptidkonzentration mit anschließender Boltzmanntransformation. Es sind zwei verschiedene RNA-Zustände charakterisiert: 100 % nicht Bindung und 100 % Bindung. Aus dem Wendepunkt dieser Funktion kann der kD-Wert der Interaktion abgeleitet werden. Er liegt bei 42 μM Peptid 12. Die Steigung an diesem Punkt verläuft negativ, so daß die konformationelle Änderung eine andere ist, als zwischen der b2a2 RNA und dem Peptid 14 (siehe Abb. 3-30).

Die Titration des Peptides 12 wurde mit einer scrambled RNA wiederholt. In diesem Fall sollte keine Interaktion mit der RNA meßbar sein. Es ist in Abbildung 3-29 zu erkennen, daß im Konzentrationsbereich bis 96 μM eine Änderung der Sekundärstruktur der RNA zu beobachten ist, die aus der veränderten Eliptizität erkannt werden kann. Trägt man diese Meßpunkte $(\theta_{\max}-\theta)/(\theta_{\max}-\theta_{\min})$ gegen die Peptidkonzentration auf, so erkennt man jedoch keine zwei Populationen, welche durch eine sigmoidale Funktion beschrieben werden kann,

sondern einen fast linearen Verlauf der Meßpunkte. Insofern kann man keinen kD-Wert ermitteln.

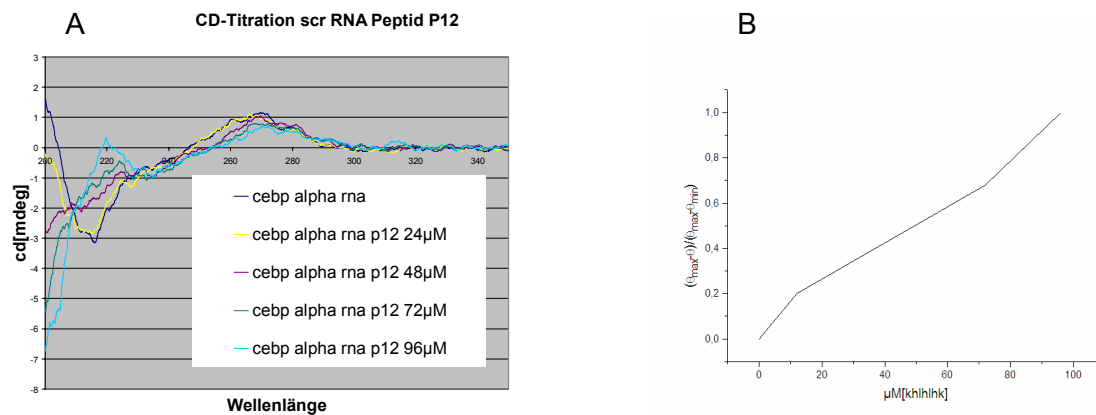


Abb. 3-29. Titriert man zu einer unspezifischen RNA (A), welche ebenso lang wie die b2a2-RNA ist und auch die Möglichkeit einer Sekundärstrukturausbildung besitzt, so erkennt man nach Auftragung $(\theta_{\max} - \theta) / (\theta_{\max} - \theta_{\min})$ gegen die Peptidkonzentration einen linearen Verlauf (B). Das Peptid interagiert mit der RNA jedoch viel schwächer als mit der b2a2-RNA, so daß man hier auch keinen kD-Wert angeben kann.

Die CD-Titrationsexperimente wurden ebenfalls mit dem Peptid 14 durchgeführt (siehe Abb. 3-30). Auch hier ist eine Abnahme der Eliptizität im Bereich zwischen 250-300 nm zu erkennen, der darauf hindeutet, daß das Peptid mit der RNA interagiert. Die Auftragung $(\theta_{\max} - \theta) / (\theta_{\max} - \theta_{\min})$ gegen die Peptidkonzentration liefert zwei zu erkennende unterschiedliche Populationen. Nach Boltzmann-Transformation erhält man für den Wendepunkt der sigmoidalen Funktion einen Wert von 52 μM \pm 11%. Dieser Wert ist gleichbedeutend mit dem kD-Wert.

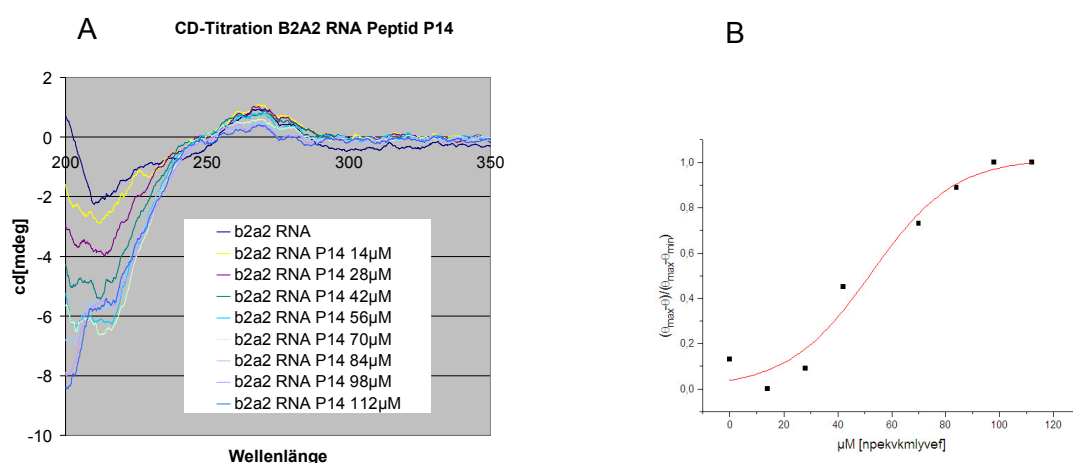


Abb. 3-30. Wird das synthetisierte Peptid 14 zu der b2a2 RNA titriert (A), so erkennt man ebenfalls eine Änderung der Eliptizität. Nach der Auftragung $(\theta_{\max} - \theta) / (\theta_{\max} - \theta_{\min})$ gegen die Peptidkonzentration (B) und Boltzmanntransformation erhält man einen kD-Wert von 52 μM . In diesem Fall ist die Steigung am Wendepunkt positiv, was durch eine unterschiedlich induzierte Konformationsänderung der RNA durch das Peptid 14 im Vergleich zu dem Peptid 12 herrührt.

Wird zu einer scrambled RNA das Peptid 14 bis zu einer Endkonzentration von 196 μM hinzutitriert, so ist eine Änderung der Eliptizität beobachtbar, welche jedoch nach Auftragung $(\theta_{\text{max}} - \theta)/(\theta_{\text{max}} - \theta_{\text{min}})$ gegen die Peptidkonzentration keine zwei Populationen erkennen läßt (siehe Abb. 3-31). Somit kann – wie auch bei Peptid 12 und der scrambled RNA (siehe Abb. 3-29) – kein K_D -Wert ermittelt werden.

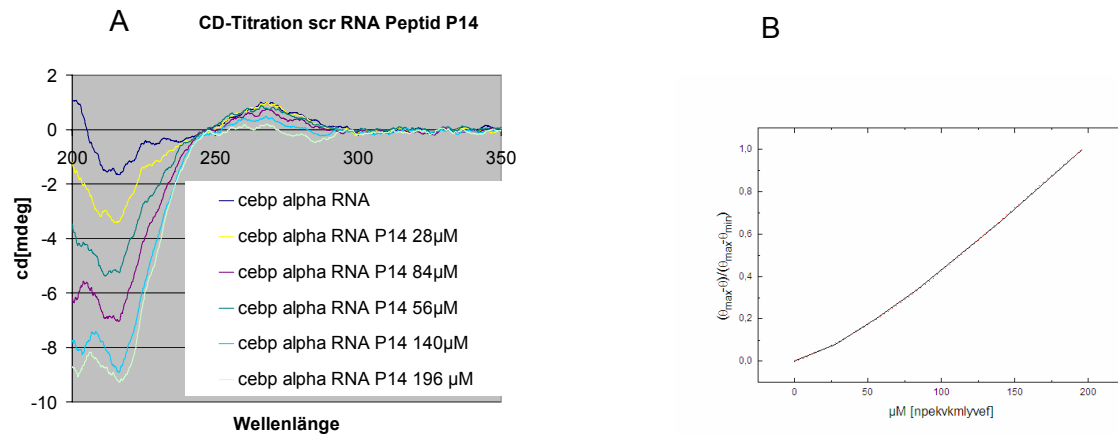


Abb. 3-31. Titriert man zu einer unspezifischen RNA das Peptid 14, so mißt man auch eine Änderung der Eliptizität (A). Nach der Auftragung $(\theta_{\text{max}} - \theta)/(\theta_{\text{max}} - \theta_{\text{min}})$ gegen die Peptidkonzentration (B) ist jedoch auch diese Funktion linear, was darauf hindeutet, daß dieses Peptid ebenfalls schwach mit der RNA interagiert und eine konformationelle Änderung induzieren kann. Jedoch ist diese Interaktion schwächer als mit der b2a2-RNA, so daß auch hier kein K_D -Wert angegeben werden kann.

Die CD-Messungen untermauern die Ergebnisse, die schon mit FCS gewonnen wurden. Die Peptide 12 und 14 interagieren mit der b2a2-RNA, wobei hier K_D -Werte ermittelt wurden, die im unteren μM -Bereich liegen. Beide Peptide zeigen bis zu einer Endkonzentration von 112 μM bzw. 196 μM (Peptid 12/14) eine schwache Interaktion mit einer scrambled RNA, wobei aus diesen Meßdaten keine K_D -Werte ermittelt werden können, da die Interaktion zu schwach im Vergleich mit der b2a2-RNA ist (siehe Abb. 3-29 und Abb. 3-31).

Aus den transformierten Daten ist ersichtlich, daß sich im Fall der b2a2 RNA mit dem Peptid 14 zwei Population darstellen lassen, während bei der Verwendung der scrambled RNA die Meßpunkte nahezu auf einer Linie liegen. Dies deutet auf strukturelle Änderung der RNA hin, jedoch konnten keine zwei verschiedenen Populationen (frei/gebunden) mit dieser Peptidkonzentration beobachtbar werden.

3.5.1 Circular Dichroitische Messungen an b2a2-RNA Mutanten

Circular Dichroitische Messungen wurden dazu verwendet den Interaktionspunkt der beiden Peptide 12 und 14 mit der b2a2 RNA zu charakterisieren. Der in Kooperation mit Prof. Göbel und Dr. Scheffer entwickelte Strukturvorschlag für den Translokationsbereich b2a2 besitzt verschiedene Strukturelemente an welchem Interaktion mit dem Peptid möglich erscheint. Grob läßt sich die Struktur in die folgenden Bereiche unterteilen: einen 7 nt langen unteren Stamm mit einer Fehlpaarung, einen unteren asymmetrischen Loop, einen 4 nt langen oberen Stamm und schließlich einen 7 nt oberen Loop, in welchen auch der Bruchpunkt zwischen bcr und abl zu finden ist (siehe Abb. 3-32).

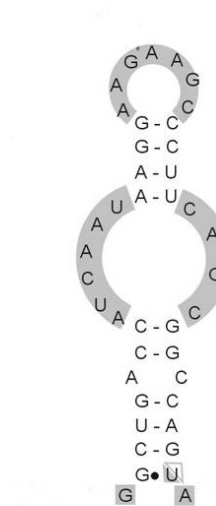


Abb. 3-32. Ausgehend von dem von uns erarbeiteten Strukturvorschlag für den b2a2-RNA Translokationsbereich wurden verschiedene Mutanten definiert, um die Interaktionsstelle der Peptide mit der b2a2-RNA zu erfassen. Im ganzen besteht unser Strukturvorschlag aus 4 Strukturelementen: einen 7 nt langen unteren Stamm mit einer Fehlpaarung, einen unteren asymmetrischen Loop, einen 4nt langen oberen Stamm und schließlich einen 7 nt oberen Loop. Diese Elemente wurden nun durch Mutationen oder Deletionen verändert und mit den Peptiden ein CD-Titrationsspektrum aufgenommen.

Es wurden nun verschiedene Oligonukleotide verwendet, welche Mutationen bzw. Deletionen in unterschiedlichen Bereichen tragen. Tab. 3-8 zeigt eine Übersicht der Sequenzen der RNA-Mutanten. Im Vergleich zur wt-Sequenz wurde bei Mutante 1 der untere Loop komplett deletiert, bei Mutante 2 findet sich eine Mutation im oberen Loop, bei Mutante 3 ist der obere Stamm mutiert und bei Mutante 4 wurde der untere Stamm mutiert. Läßt man diese Sequenzen jeweils von MFold analysieren, so erkennt man, daß diese Mutanten die gleiche errechnete Sekundärstruktur haben wie der Wildtyp (Anhang I), nur bei Mutante 1 fehlt der untere Loop, die restliche Struktur ist jedoch identisch. Es wurden zwei weitere

Mutanten ausgewählt, deren Analyse der Sekundärstruktur von der des Wildtypes abweicht. Mutante 5, eine Deletion des unteren Stammes, wobei nur der linke Bereich des Stamms deletiert wurde sowie Mutante 6 eine Deletion des oberen Stamms, wobei ebenfalls nur der linke Bereich des Stamms deletiert wurde. Die resultierenden Strukturanalysen sind im Anhang zu finden.

Mutante	Unterer Stamm	Unterer Loop	Oberer Stamm	Oberer Loop	Oberer Stamm	Unterer Loop	Unterer Stamm
wt	GCUGACC	AUCAAU	AAGG	AAGAAGC	CCUU	CAGC	GGCCAGUA
1 Deletion unterer Loop	GCUGACC	-	AAGG	AAGAAGC	CCUU	-	GGCCAGUA
2 Mutation oberer Loop	GCUGACC	AUCAAU	AAGG	TGCTTAT	CCUU	CAGC	GGCCAGUA
3 Mutation oberer Stamm	GCUGACC	AUCAAU	GAGA	AAGAAGC	UCUC	CAGC	GGCCAGUA
4 Mutation unterer Stamm	TAGTCGC	AUCAAU	AAGG	AAGAAGC	CCUU	CAGC	GCGACTA
5 Part Del unterer Stamm	-	AUCAAU	AAGG	AAGAAGC	CCUU	CAGC	GGCCAGUA
6 Part Del oberer Stamm	GCUGACC	AUCAAU	-	AAGAAGC	CCUU	CAGC	GGCCAGUA

Tab. 3-8 zeigt die RNA-Sequenzen der wt- und Mutanten b2a2-RNA. Die Sequenz ist in die jeweiligen strukturellen Bereiche unterteilt, daß erkannt werden kann wo die Mutationen eingefügt wurden. Während die ersten 4 Mutation strukturkonservierend sind (Analyse nach MFold), so liefert MFold für die letzten zwei Mutationen einen vom wt abweichenden Strukturvorschlag.

Die verschiedenen RNA Mutanten wurden durch In-vitro-Transkription synthetisiert. Tab. 3-9 gibt einen Überblick über die Oligonukleotid-Sequenzen.

1 Deletion unterer Loop	TAC TGG CCA AGG GCT TCT TCC TTG GTC AGC CCT ATA GTG AGT CGT ATT
2 Mutation oberer Loop	TAC TGG CCG CTG AAG GAT AAG CAC CTT ATT GAT GGT CAG CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA AT
3 Mutation oberer Stemm	TAC TGG CCG CTG GAG AGC TTC TTT CTC ATT GAT GGT CAG CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT
4 Mutation unterer Stemm	TAG TCG CGC TGA AGG GCT TCT TCC TTA TTG ATG CGA CTA CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT
5 Partielle Deletion unterer Stemm	TAC TGG CCG CTG AAG GGC TTC TTC CTT ATT GAT CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT
6 Partielle Deletion oberer Stemm	TAC TGG CCG CTG AAG GGC TTC TTA TTG ATG GTC AGC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT

Tab. 3-9. beinhaltet die Oligonukleotidsequenzen der RNA-Mutanten, welche nach Hybridisierung mit dem T7-Promotor als DNA-Template für die In-vitro-Transkription dienten.

Mit den transkribierten, gereinigten Mutanten-RNAs wurde nun eine CD-Titration durchgeführt, ebenso wie sie auch zur Interaktionsbestimmung der Peptide 12 und 14 mit der wt-b2a2-RNA durchgeführt wurden. Die RNA wurde vorgelegt und Peptid wurde hinzutitriert. Nach jedem Schritt wurde ein CD-Spektrum aufgenommen. Falls eine Interaktion zu beobachten war, konnte aus den Daten ein k_D -Wert ermittelt werden. Je nach dem mit welcher RNA-Mutante das jeweilige Peptid in Interaktion trat, konnte daraus abgeleitet werden, welche RNA-Bereiche für die Peptid-Interaktion essentiell sind und welche nicht.

Die Ergebnisse der CD-Titration der Peptide 12 und 14 zu RNA Mutante 1 werden hier im Detail besprochen. Die restlichen CD-Spektren werden in Anhang II gezeigt.

Nimmt man CD-Spektren mit der RNA-Mutant 1 auf (siehe Abb. 3-33), wobei Peptid 12 bis zu einer Konzentration von 132 μ M hinzutitriert wird, so kann man aus der Auftragung $(\theta_{\max}-\theta)/(\theta_{\max}-\theta_{\min})$ gegen die Peptidkonzentration und der anschließenden Boltzmann-Transformation zwei verschiedene Populationen erkennen, wobei der Wendepunkt dieser Funktion dem k_D -Wert (62 μ M) des Peptides 12 mit der Mutante 1 entspricht. Man kann entsprechend daraus ableiten, daß eine Deletion des unteren Loops keinen Einfluß auf die RNA-Peptid-Interaktion hat. Dieser Bereich ist demnach nicht wichtig für die Interaktion des Peptides 12 mit der b2a2 RNA.

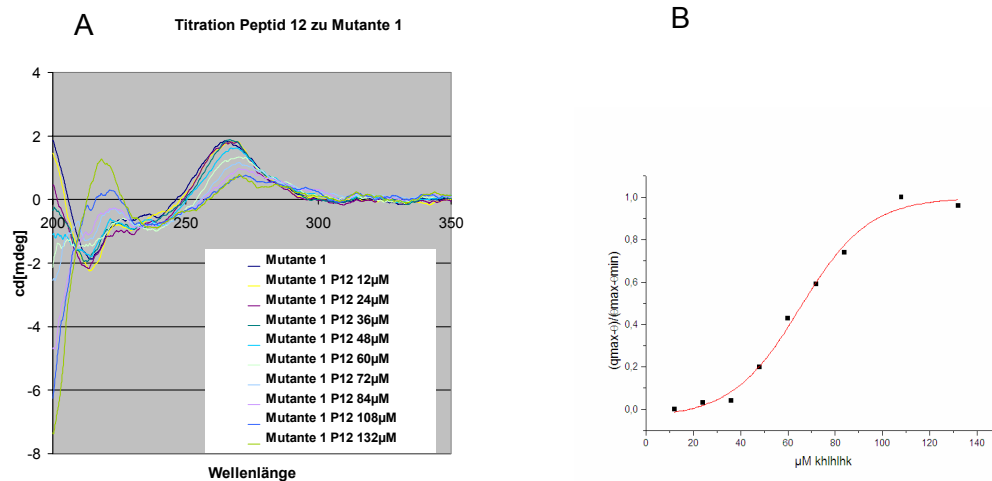


Abb. 3-33. Gezeigt wird das Ergebnis der CD-Titration der b2a2 Mutante 1 mit dem Peptid 12. Man mißt eine Veränderung der Eliptizität (A). Nach Auftragung $(\theta_{\max}-\theta)/(\theta_{\max}-\theta_{\min})$ gegen die Peptidkonzentration (B) erkennt man einen sigmoidalen Verlauf der Kurve, durch die sich eine Boltzmanntransformation legen läßt. Aus dem Wendepunkt kann der kD von 62 µM ermittelt werden. Mutante 1 kann also mit dem Peptid 12 interagieren. Bei Mutante 1 fehlt der untere Loop, so daß man davon Ausgehen kann, daß dieser RNA Bereich keinen Einfluß auf die RNA-Peptid Interaktion besitzt (Siehe Abb. 3-34).

Ein anderes Bild ergibt sich, wenn Peptid 14 zu der RNA Mutante 1 titriert (siehe Abb. 3-34) und CD-Spektren aufnimmt. Bis zu einer Konzentration von 84 µM ändert sich der Verlauf des Spektrums nur sehr wenig, so daß davon auszugehen ist, daß hier keine Interaktion der Mutante mit dem Peptid stattfindet. Aus diesem Grund ist anzunehmen, daß der untere Loop eine Rolle an der Interaktion des Peptides P14 mit der b2a2-wt-RNA spielt.

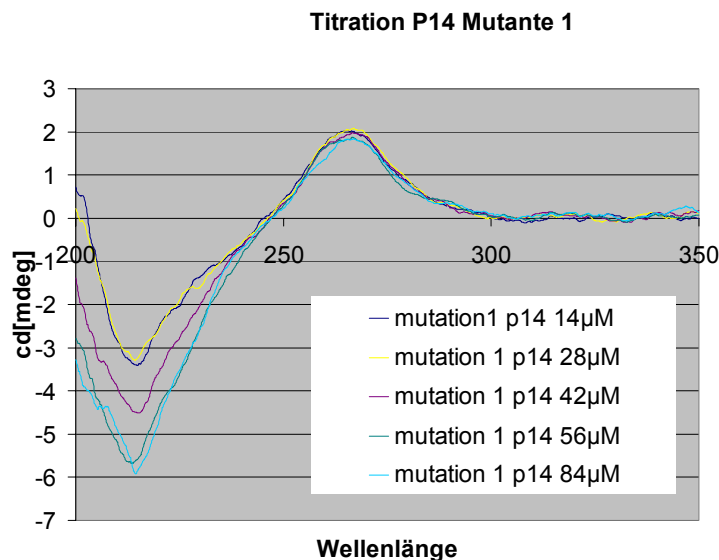


Abb. 3-34. Titriert man Peptid 14 zu der b2a2-Mutante 1 so erkennt man bis zu einer Peptidkonzentration von 84 µM keine Veränderung der Eliptizität. Diese Konzentration liegt über dem kD-Wert der b2a2-wt-RNA mit dem Peptid 14. Da eine Interaktion hier nicht beobachtet werden kann, so scheint der hier deletierte untere Loop eine Rolle in der Peptid-RNA Interaktion bei Peptid 14 zu spielen.

Die CD-Spektren und Boltzmann-Transformationen der restlichen RNA-Mutanten bei der Titration mit den Peptiden 12 und 14 sind im Anhang II.

Die Tab. 3-10 gibt einen Überblick der Interaktion der Peptide 12 und 14 mit der jeweiligen Mutante. Wenn Interaktion während der CD-Titration detektierbar war, so stehen hier die nach Boltzmann-Transformation erhaltenen kD-Werte der jeweiligen Mutanten-RNA.

Mutation Nummer	Mutation Art	kD Peptid P12 [μ M]	kD Peptid P14 [μ M]
1	Deletion unterer Loop	62	-
2	Mutation oberer Loop	-	-
3	Mutation oberer Stamm	-	-
4	Mutation unterer Stamm	61	49
5	Partielle Deletion unterer Stamm	73	-
6	Partielle Deletion oberer Stamm	45	-
wt	wt	42	52

Tab. 3-10. beinhaltet das Ergebnis der CD-Titration unter Verwendung der b2a2-RNA Mutanten. Sollte ein kD-Wert angegeben sein, so interagiert die entsprechende Mutante mit dem Peptid, fehlt ein kD-Wert, so konnte keine Interaktion mit dem Peptid und der RNA Mutante detektiert werden. Aus diesem Interaktionsplot kann man den Ort der RNA-Peptid-Bindung ermitteln.

Peptid 12 interagiert bei allen Mutanten, bei welchen der obere Loop (Mutante 2) bzw. der obere Stamm (Mutante 3) nicht mutiert ist. Für die Interaktion der b2a2-RNA mit dem Peptid 12 sind demnach der obere Loop und der obere Stamm von Bedeutung. Das Peptid 14 ist länger als das Peptid 12 (12 Aminosäuren zu 7 Aminosäuren), so daß die Vermutung nahe liegt, daß das Peptid einen größeren Interaktionsbereich mit der RNA besitzt.

Nach den Meßdaten interagiert das Peptid 14 nur mit der RNA Mutation 4. Bei dieser Mutation ist der untere Stamm mutiert. Nur dieser Bereich spielt keine Rolle bei der b2a2-RNA Interaktion mit dem Peptid 14. Der restliche Bereich (oberer Loop, oberer Stamm, unterer Stamm) wird für die Interaktion mit dem Peptid benötigt.

Aus der Tab. 3-10 ist zu erkennen, daß keine Wechselwirkung zwischen Peptid 12 und denjenigen Mutanten beobachtbar war, bei denen der obere Loop bzw. der obere Stamm mutiert waren. Erstaunlicherweise konnte eine Interaktion bei der Mutante beobachtet werden, bei welcher die rechte Seite des oberen Stamms fehlt. Für die Interaktion zwischen dem 7mer Peptide 12 und der b2a2-wt-RNA sind demnach der obere Loop und die rechte Seite des oberen Stamms notwendig. Ganz anders verhält sich das 12mer Peptid 14. Eine Interaktion mit der RNA war nur detektierbar, wenn der untere Stamm mutiert war.

Das heißt dieser Bereich spielt für die RNA-Interaktion keine Rolle. Alle anderen Bereiche – oberer Stamm und Loop sowie unterer Loop – sind anscheinend für die Peptid-RNA-Interaktion notwendig.

3.6 Dual Luziferase Assay zur Bestimmung des Einflusses der Peptide auf die Genexpression eines Reportergenes

Um zu testen, ob die gefundenen spezifischen Peptide 12 und 14 einen selektiven Einfluß auf die Expression eines Reportergenes besitzen, wurde ein gekoppeltes In-vitro-Transkription/Translations Experiment in An- bzw. Abwesenheit der synthetisierten Peptide durchgeführt. Vor die Renilla-Luciferase, die als Reporter dient, wurde zwischen dem T7-Start und dem ersten Startcodon die b2a2-RNA-Sequenz kloniert. Als interne Kontrolle wurde die unter dem T7-Promotor stehende Firefly-Luciferase verwendet. Sollten die Peptide spezifisch die b2a2-RNA-Sequenz binden und einen Effekt auf die Expression haben, dann sollte der Anteil der Renilla-Luciferase im Vergleich zu der Firefly-Luciferase geringer ausfallen. Die Aktivität der verschiedenen Luziferasen wurden mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System ermittelt. Dieses empfindliche System macht es sich zunutze, daß die Firefly-Luciferase in Gegenwart von Magnesium Beetle Luciferin zu Oxyluciferin und Licht umsetzt, während die Renilla-Luziferase die Reaktion Coelenterazine zu Coelenteramide und Licht katalysiert. Es ist also möglich in dem gleichen Reaktionsgefäß die Aktivität der Renilla- bzw. Firefly-Luziferase getrennt voneinander zu ermitteln.

Zunächst wurden in drei unabhängigen Messungen die Wasser und Quench-Kontrolle vermessen und es wurde geprüft, ob die b2a2-RNA-Sequenz einen Einfluß auf die Expression des Reporters besitzt (siehe Abb. 3-35). Nach gekoppelter In-vitro-Transkription/Translation ohne Peptide wurde die Aktivität der Luziferasen ermittelt. Zunächst wurde die Aktivität der Firefly ermittelt, dann wurde das entsprechende Substrat für die Renilla hinzugegeben inklusive einem Quencher für die Firefly Luziferase und schließlich wurde die Aktivität der Renilla Luziferase ermittelt.

Diesen Quencheffekt erkennt man bei der Messung (B) (siehe Abb. 3-35; wt/-). Hier wurde die wt-Firefly Kontrolle alleine verwendet. Wie zu erwarten war, ist eine Aktivität der Firefly meßbar, während nach Zugabe des Renilla Substrates die Aktivität der Firefly um etwa 4 log –Stufen quencht war und liegt damit fast auf dem Niveau des Wasser-Wertes.

Der Einfluß der b2a2-RNA-Struktur wurde bestimmt, indem jeweils wt-Firefly und wt-Renilla (C) mit den Werten der wt-Firefly sowie b2a2-Renilla (D) verglichen wurde. Es ist hier kein Unterschied in der Aktivität der Firefly zu erkennen, so daß man unter dieser Berücksichtigung Vergleiche zwischen der wt-Renilla und b2a2-Renilla tätigen kann.

Die Aktivität der b2a2-Renilla ist im Vergleich zu der wt-Renilla etwa um eine log-Stufe vermindert. Das verwendete Retikulozyten-System ist empfindlich auf Sekundärstrukturen um 5'-Bereich vor dem Startcodon, so daß man hier einen indirekten Nachweis des Vorhandenseins einer Sekundärstruktur hat, welche für diese Aktivitätsabnahme verantwortlich ist (siehe Abb. 3-35 wt/wt und wt/b2a2).

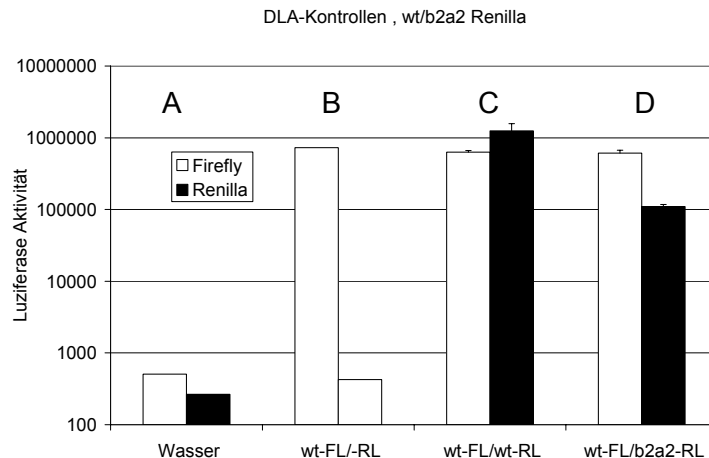


Abb. 3-35. Zunächst wurde der Quencheffekt des Stop&Glow Substrates auf die Firefly Luziferase überprüft. Die Ergebnisse dieses Experiments verdeutlichen dies (B). Hier wurde die Firefly Luziferase exprimiert und die Aktivität gemessen. Während die Aktivität der Firefly mit dem Firely-Substrat bei etwa 1.000.000 liegt, geht dieser Wert nach Zugabe von dem Quencher auf unter 1.000 zurück. Experiment (C) und (D) befaßt sich mit dem Einfluß der b2a2 Sekundärstruktur auf die Expression des Renilla-Reporters. Die interne Kontrolle (Firefly) hat bei diesen Experimenten vergleichbare Aktivität. Die Aktivität des Reporter-Konstruktes ist bei der Verwendung des b2a2-Konstruktes im Vergleich zum wt-Reporter Konstrukt um etwa eine log-Stufe verringert. Das läßt sich dadurch erklären, daß das verwendete Reticulozyten-Lysat empfindlich auf die Expression reagiert, wenn im 5'-UTR der RNA eine Sekundärstruktur vorhanden ist. Somit ist dies ein indirekter Nachweis der b2a2 Sekundärstruktur (C) und D) sind Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen; FL: Firefly Luziferase, RL Renilla Luziferase).

In folgenden Experimenten wurde nun der Einfluß der spezifischen Peptide 12 und 14 auf die Expression des Reporters untersucht. Während der 90-minütigen Translation/Transkription wurde insgesamt 3x alle 30' 1 mM Peptid hinzugegeben. Es wurden die beiden spezifischen Peptide 12 und 14 sowie ein unspezifisches Peptid 56a verwendet.

Betrachtet man sich die Mittelwerte (siehe Abb. 3-36) der Aktivität aus 3 unabhängigen Messungen, so erkennt man keinen Unterschied zwischen dem Experiment ohne Peptid (A) sowie mit dem unspezifischen Peptid 56a (D). Unter Verwendung des Peptides 12 erkennt man eine Abnahme sowohl der Firefly als auch der Renilla Aktivität in etwa gleichem Verhältnis (B). Die Abnahme der Aktivität der Renilla Luziferase im Vergleich zu der Firefly Luziferase ist bei der Anwesenheit von Peptid 14 ausgeprägter. Dieses wird deutlich, wenn man den Quotienten aus der Aktivität der Renilla und Firefly bildet (siehe Abb. 3-37).

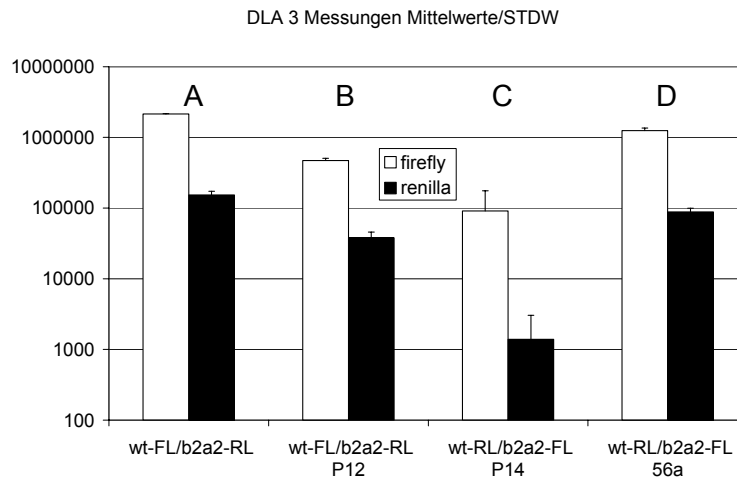


Abb. 3-36. Um den Einfluß der Peptide auf die Expression der Reporterkonstrukte zu ermitteln, wurden während der In-vitro-Transkription/Translation die entsprechenden Peptide hinzugegeben. Die Peptide wurden zu 3 Dosen zu je 1 mM zu der Reaktion gegeben. Bei dem unspezifischen Peptid 56a (dieses Peptid wurde durch ein Phage-Display gegen die *c/ebpα* RNA-Struktur gewonnen)(D) kann keine Veränderung der Aktivität im Vergleich zu dem Experiment ohne Peptidzugabe (A) gemessen werden. Im Fall der Peptide 12 und 14 ist eine Reduktion der Aktivität zu beobachten. Während Peptid 12 (B) sowohl die Aktivität der Firefly und auch der Renilla in etwa gleichen Maßen reduziert, so ist bei Verwendung des Peptides 14 (C) das die Renilla Aktivität am effektivsten reduziert. (siehe Abb. 3-37; A) bis D) sind Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen; FL: Firefly Luziferase, RL Renilla Luziferase)

Der Quotient (siehe Abb. 3-37) der Renilla und Firefly Aktivität ist um so kleiner, je stärker die Renilla-Aktivität abnimmt. Während Peptid 12 (B) sowie das unspezifische Peptid 56a (D) keinen Effekt auf das Verhältnis der Aktivität besitzt, konnte der Quotient bei Peptid 14 von 0,7 (ohne Peptid,(A)) auf 0,15 (Peptid 14, (C)) reduziert werden. Es konnte gezeigt werden, daß das Peptid 14 die Expression der b2a2-Renilla im Vergleich zur Expression der wt-Firefly um den Faktor 5 herunterreguliert.

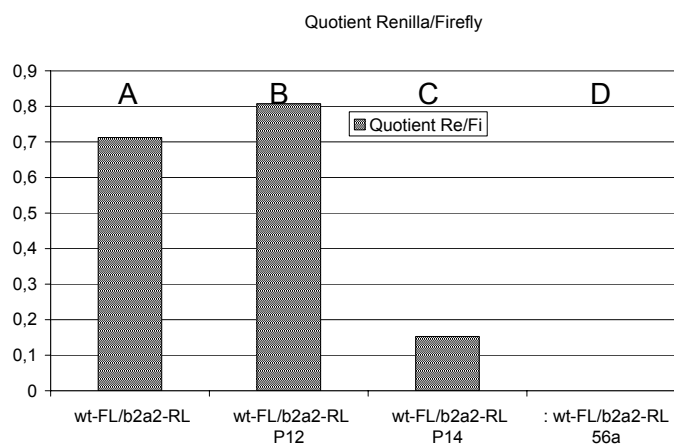


Abb. 3-37. Dieser Quotient ist aus den Werten von Abb. 3-36 gebildet worden. Der Quotient Aktivität Renilla und Firefly ist um so kleiner, je stärker die Renilla-Aktivität abnimmt. Während Peptid 12 (B) sowie das unspezifische Peptid 56a (D) keinen Effekt auf das Verhältnis der Aktivität besitzt. Konnte der Quotient bei Peptid

14 von 0,7 (ohne Peptid, (A)) auf 0,15 (Peptid 14, (C)) reduziert werden. Um den Faktor 5 ist die Aktivität der Renilla im Vergleich zu der Firefly-Aktivität herunterreguliert. (FL: Firefly Luziferase, RL Renilla Luziferase)
 Es wurde nun die b2a2-wt-Sequenz gegen eine RNA Mutante ausgetauscht, bei der in der CD-Titration bis 84 μ M keine Interaktion zwischen dem Peptid 14 und der b2a2-Mutante detektierbar war (siehe Tab. 3-10). Die Mutante ist RNA-Mutante Nummer 5, der partiellen Deletion im unteren Stamm. Gezeigt ist die jeweilige Luziferase-Aktivität der b2a2 Mutante 5 ohne bzw. mit Peptid 14 (A) (siehe Abb. 3-38).

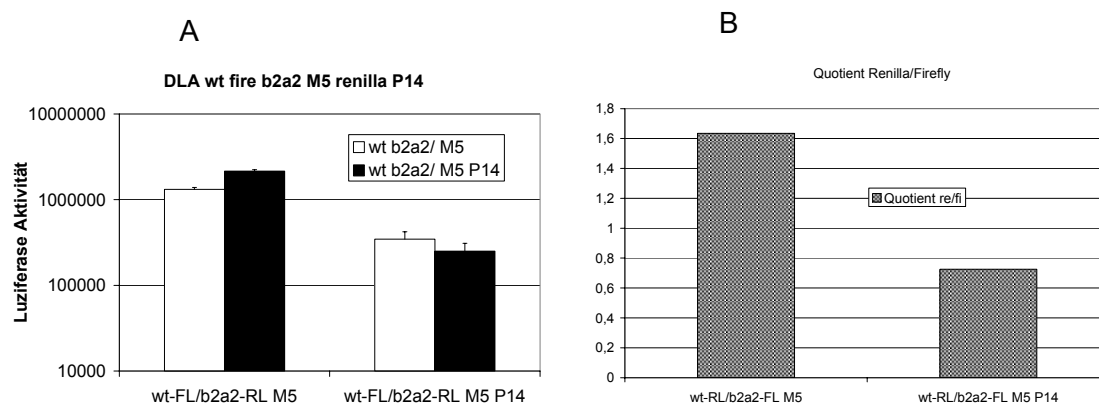


Abb. 3-38. Es wurde die wt-b2a2-Sequenz gegen eine RNA-Mutanten-Sequenz getauscht. Bei der CD-Titration zeigte diese Mutante 5 keine Interaktion mit dem Peptid bis zu einer Konzentration von 84 μ M. Bildet man den Quotient der Aktivitäten (B) so erkennt man trotzdem eine Reduktion der Renilla Aktivität. Dies kann man durch die relativ hohe Peptidkonzentration erklären, die mit 1 mM auch die b2a2-Struktur bindet, an welcher die Bindungsstellen nicht vollständig vorhanden sind. Die Aktivitäten in Diagramm A sind Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen; FL: Firefly Luziferase, RL Renilla Luziferase

Wie man am Quotienten erkennen kann (siehe Abb. 3-38; B) besitzt das Peptid 14 auch einen Effekt auf die Expression der b2a2 Mutante M5. Dies kann man auf die hohe Konzentration des Peptides zurückführen. Um die Resultate zwischen dem wt-b2a2 und der Mutante 5-b2a2 zu vergleichen, wurden die Quotienten auf jeweils ohne Peptid normiert (siehe Abb. 3-39). Peptid 12 wurde hier nicht weiter untersucht, weil es schon vorher keinen Effekt auf die Expression des Reporters zeigte (siehe Abb. 3-37).

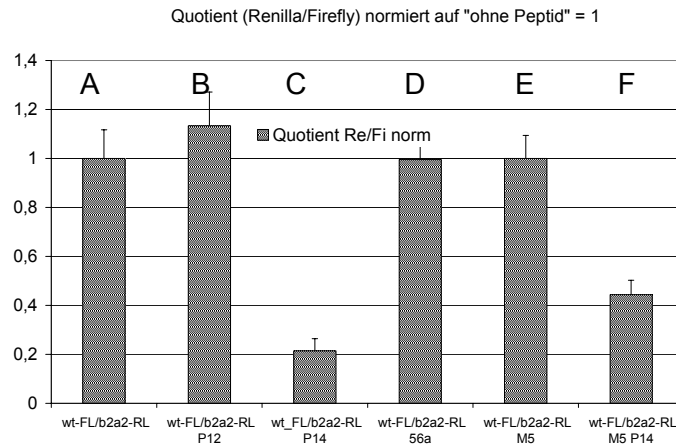


Abb. 3-39. Um die Quotienten der verschiedenen Experimente zu vergleichen, ist es notwendig diese zu normieren. Der Quotient, der ohne das Peptid ermittelt wurde, wurde auf eins gesetzt (A und E). Im Fall der b2a2-wt Sequenz mit dem Peptid 14 wird der Quotient von 1 auf 0,2 (C) reduziert. Im Fall der b2a2-Mutante wird dieser auf 0,45 reduziert (F). Die Reduktion der Renilla-Aktivität ist bei der b2a2-wt-RNA mit dem Peptid 14 am ausgeprägtesten, während diese Reduktion bei der b2a2-Mutanten-RNA nur etwa 50% des Wertes im Falle der wt-RNA-Sequenz erreicht. (FL: Firefly Luziferase, RL Renilla Luziferase)

Bei diesem Vergleich (siehe Abb. 3-39) ist zu erkennen, daß unter Verwendung der wt-b2a2 und Peptid 14 eine Reduktion der Renilla Aktivität um den Faktor 5 gemessen werden kann (B). Dieser Faktor reduziert sich auf etwa 2 unter Verwendung der Mutanten b2a2 (F). Der Effekt auf die Expression der Renilla kann durch Verwendung der Mutanten b2a2 demnach teilweise wieder aufgehoben werden.

Um zu unterscheiden, ob das Peptid 14 einen Effekt auf die Transkription oder auf die Translation besitzt, wurden diese Reaktionen voneinander getrennt. Nach Transkription der jeweiligen RNAs und Reinigung wurde die Translation mit einem nuklease behandelten Kaninchenlysats begonnen. Erst hier wurde das Peptid 14 verwendet (siehe Abb. 3-40).

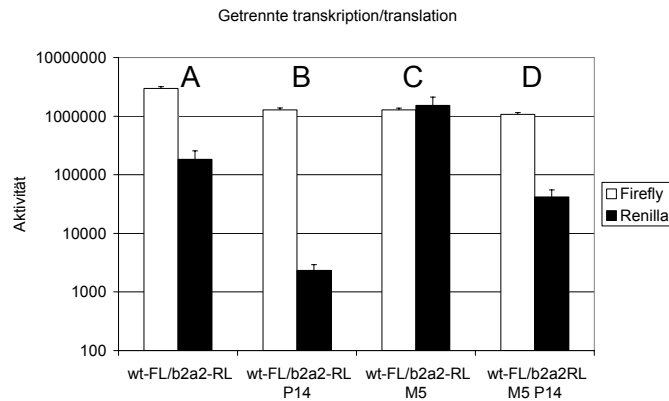


Abb. 3-40 Um den Einfluß der Peptide auf die Translation zu überprüfen, ist es notwendig, zunächst die Transkription, dann in Gegenwart der Peptide die Translation durchzuführen. Bei diesem Experiment wurde gereinigte wt und b2a2 sowie b2a2-Mutanten Firefly/Renilla-RNA verwendet und in Gegenwart der Peptide wurde die Translation durchgeführt. Es ist zu erkennen, daß auch in diesem Fall das Peptid 14 die Aktivität der Renilla Luziferase reduziert (B). Dieser Effekt kann durch die Verwendung der RNA-Mutante 5 teilweise wiederhergestellt werden (D). Das Peptid 14 bindet demnach die b2a2-RNA Struktur und erreicht dadurch eine Reduktion der Translation des Reporters Renilla-Luziferase. Alle Ergebnisse sind Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen; FL: Firefly Luziferase, RL Renilla Luziferase

Die Aktivität wurde ebenso wie bei der vorangegangenen Messung ermittelt. In dem Fall der getrennten Transkription/Translation ist ein signifikanter Rückgang (Student's T-Test (zweiseitig, gepaart): wt/b2a2: 0,00187; wt/b2a2 M5: 0,2655) der b2a2 Renilla Luziferase Aktivität um einen Faktor von etwa 50 zu beobachten. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, daß das Peptid den b2a2 RNA-Bereich bindet und somit die Translation vermindert.

4 Diskussion

Die Translokation t(9;22) kodiert für eine chimäre mRNA von welcher das BCR-ABL Protein translatiert wird und welches verantwortlich für Philadelphia Positive Leukämien ist. Bei fast allen adulten Chronischen Myeloischen Leukämien und bei etwa 30% aller Akuten Lymphatischen Leukämien wird diese Translokation gefunden. Diese chimäre mRNA kann nur in den transformierten Zellen gefunden werden und bietet einen einzigartigen Sequenzbereich um den Translokationsbruchpunkt als Ziel für eine therapeutische Intervention. Bisherige Therapien richten sie gegen das BCR-ABL Protein. Der Tyrosinkinaseinhibitor STI571 bindet spezifisch die BCR-ABL Tyrosinkinasedomäne und verhindert dadurch die Bindung von ATP. Diese Therapie besitzt nur geringe Nebenwirkungen, jedoch entwickeln sich im Laufe der Zeit sehr häufig Resistenzen gegen diesen Inhibitor. Es ist also notwendig, zusätzliche Angriffspunkte zu definieren um eine Resistenzentwicklung zu erschweren. Der mRNA Translokationsbereich bietet einen solchen zusätzlichen Angriffspunkt. Das Ziel ist es, durch Ligandenbindung an diesem Bereich die mRNA zu zerstören oder die Expression von BCR/ABL zu unterbinden.

Durch Nukleinsäure basierende Ansätze zum Abbau der Bcr-Abl mRNA wurden folgende Versuche durchgeführt.

- Antisense-ODNs war die erste Methode, mit welcher versucht wurde, die Expression von BCR-ABL durch Nukleinsäuren zu regulieren. In Tierversuchen wurde bei leukämischen Mäusen das Wachstum von Ph positiven Zellen durch BCR-ABL gerichtete Antisense-ODNs unterdrückt (Skorski et al 1994/1996). Auch verringern diese Antisense-ODNs die Formation von Kolonien bei CML (Szczylik et al 1991, de Fabritiis et al 1993/1995). Dieser Ansatz wurde dann für die Reinigung von Knochenmark bei CML-Patienten verwendet. Um eine Vielzahl der Probleme, wie die Toxizität, die Zellaufnahme in vivo zu umgehen, wurden Antisense-ODNs gegen BCR-ABL dazu verwendet, Knochenmark von BCR-ABL mRNA ex vivo zu reinigen.

Für eine klinische Versuchsreihe (Fabritiis et al 1998) wurden bei 35 Patienten mit CML der Einfluß der Antisense-ODNs geprüft. Acht Patienten wurden aus diesen 35 in einem Vorversuch ausgewählt, da die Knochenmarkzellen dieser acht Patienten sensitiv auf die Antisense-ODNs waren und das Koloniewachstum veränderten. Nach Entnahme des Knochenmarks wurden

die Probanden mit Busulfan konditioniert und das entnommene Knochenmark mit Antisense-ODNs gegen BCR-ABL inkubiert. 72 Stunden später wurde das gereinigte Knochenmark zurückgegeben. Von diesen acht Probanden zeigten zwei zunächst ein Ansprechen auf diese Therapie, jedoch wurde die Schwere des Krankheitsverlaufes nicht verbessert. Bei den restlichen Probanden wurde kein signifikantes Ansprechen auf diese Therapie beobachtet.

Bei 2 von 6 ausgewählten (33 %) bzw. bei 2 aus 35 an dieser Studie beteiligten (5 %) wurde ein Effekt beobachtet, welcher zunächst das Krankheitsbild verbesserte, jedoch die Schwere des Krankheitsverlaufes nicht veränderte. Diese Zahlen waren ernüchternd, so daß man die Antisense-Therapie nicht weiter verfolgt.

- Auch mit Ribozymen wurde, ähnlich wie mit den Antisense-ODNs, ein Experiment durchgeführt, was die Reinigung von CML-Zellen in vitro zum Ziel hatte (Mendoza-Maldonado et al 2002). Es wurden zwei verschiedene retrovirale Vektoren für die Expression des Ribozymes verwendet, die sich folgendermaßen unterschieden:

- Der erste Vektor bestand aus einem b3a2-Ribozym in Fusion mit dem humanen U1 Gen. Transkribiert wird dieses durch die RNA Polymerase II und das Expressionsprodukt wird in den Kern dirigiert. Die Konzentration an dem Ribozym ist somit im Kern höher als im Zytosol.
- Der zweite Vektor besaß ebenfalls ein b3a2 Ribozym, wurde allerdings mit dem adenoviralen VA1 RNA Gen fusioniert. Hierdurch erreicht man eine Anreicherung des Ribozyms im Zytoplasma.

Zwei Tage nach transduktion in leukämische 32D-Zellen, konnte kein BCR-ABL-Protein durch Westernblot bei beiden Konstrukten nachgewiesen werden. Bis zum Tag 5 wurde dieses wieder detektierbar, jedoch lag die Konzentration signifikant unter den Kontrollzellen ohne Ribozym. Auffällig ist, daß die Konzentration der bcr-abl mRNA bei dem VA1 Konstrukt deutlich unter der des U1 Konstruktes liegt. Dies ist mit der Beobachtung in Übereinstimmung, daß kernlokalisierte Ribozyme ihre Ziel-RNA schlechter degradieren, als diejenigen, welche im Zytosol anzutreffen sind (Bertrand et al 1997, Good et al 1997).

Es wurden anschließend Knochenmarkzellen von drei CML-Patienten entnommen und mit dem VA1-Konstrukt transduziert. Bei allen Proben wurde das b3a2-Transkript effektiv reduziert. Durch kompetitive RT-PCR wurde nach 2 bzw. 5 Tagen eine geringere Konzentration an diesem Transkript ermittelt.

- Die Verwendung von siRNA zur Induktion der RNA-Interferenz ist die zuletzt entdeckte Methode der nukleinsäure basierenden Gen Stummschaltung. Es handelt sich hierbei um einen endogenen Mechanismus, der ein funktionierendes RNAi-System in der Zelle voraussetzt. Bis jetzt ist unklar, ob dies bei allen Zellen, im speziellen, bei den transformierten Zellen, gegeben ist. Für eine Untersuchung (Wilda et al 2002) wurden die BCR-ABL positiven K562 Zellen verwendet. Die verwendete siRNA bestand aus zwei 19 nt langen Sequenzen, wobei am 5'-und am 3'-Ende jeweils 2 nt Überhänge vorhanden waren. 11 nt stammen von dem BCR-Bereich der mRNA und 8 nt vom ABL-Bereich der mRNA. 48 Stunden nach der Transfektion mit der siRNA konnte man im Westernblot eine Abnahme an BCR-ABL Protein beobachten. Ebenso wurden die Zellen apoptotisch. Die transformierten BCR-ABL-Zellen proliferieren ohne IL3 im Medium, diejenigen mit blockierter oder fehlender BCR-ABL Tyrosinkinase jedoch wurden wegen des fehlenden Interleukins apoptotisch. Ein Problem war hierbei der transiente Effekt des RNAi-Systems, weil hier RNA-Oligonukleotide transfiziert wurden, welche nach und nach von der Zelle degradiert wurden. Um dies zu umgehen besteht die Möglichkeit siRNA unter dem polIII Promotor durch Retroviralektoren in die Zielzelle zu bringen. Auf diese Weise wird der transiente Effekt umgangen.

Alle diese drei beschriebenen Methoden haben das bisher noch ungelöste Problem, auf welche Weise die Liganden in die Zielzelle gebracht werden. Im Fall der Knochenmarkreinigung mit Antisense-ODNs oder Ribozymen ist man dieses Problem dadurch umgangen, daß die Zellen ex vivo behandelt wurden. Ein anderer Ansatz ist die Suche nach Liganden mit besseren pharmakologischen Eigenschaften, wie modifizierte Peptide oder von Peptiden abgeleitete Mimetika.

Sollte es möglich sein, niedermolekulare Substanzen zu finden, die diesen mRNA Translokationsbereich binden können und diese Substanzen einen Einfluß auf die Expression des Fusionsproteines hätten, dann wäre dies ein zusätzlicher Ansatz für eine Therapie von BCR-ABL positiven Leukämien.

Die RNA besitzt heterozyklische Basen und ein negativ geladenes Rückgrat welche als Interaktionspunkte mit niedermolekularen Substanzen verwendet werden können. Zusätzlich dazu kann sich die RNA in Strukturen falten und auf diese Weise einzigartige Epitope für die Interaktion mit niedermolekularen Liganden formen. Eine Struktur begünstigt demnach die Interaktion mit den RNA-Liganden.

Da es für die bcr-abl mRNA keine strukturellen Information gab, war es im ersten Schritt notwendig, diese mRNA nach Sekundärstrukturelementen zu analysieren. Bei dieser Analyse wurde das etablierte Programm MFold von Zuker verwendet. Dieses Programm analysierte die RNA durch einen mathematischen Algorithmus, der einige Limitationen verwendet:

- Es können keine Konformationsänderungen beschrieben werden
- Beschränkung der Faltung auf Watson-Crick-Basenpaarung
- Die Strukturvorhersage findet in Gegenwart von 1M NaCl statt, divalente Ionen fehlen
- Limitierung der zu analysierenden RNA Größe
- Die Temperatur ist auf 37 °C eingestellt

Diese Limitationen spielen bei der hier durchgeführten Analyse keine entscheidende Rolle, wie im Folgenden deutlich wird: Es ging bei der Strukturanalyse darum Bereiche zu definieren, welche die Möglichkeit einer Sekundärstrukturfaltung besitzen. Ladungsabschirmende divalente Ionen sowie nicht Watson-Crick-Basenpaarung werden hauptsächlich für die Faltung in Tertiärstrukturen der RNA benötigt, können also bei dieser einfachen Betrachtung unberücksichtigt bleiben. Konformationsänderungen setzten unterschiedliche Strukturen voraus, jedoch wird MFold an dieser Stelle kein eindeutiges Ergebnis liefern, so daß diese Bereiche in der Auswertung unberücksichtigt bleiben. Da kurze Bereich mit einer Länge von unter 100 nt für die Strukturbildung gesucht werden, spielt die Limitierung der RNA Länge keine Rolle. Anhand von diesen Betrachtungen, sollte es möglich sein, durch MFold Bereiche zu definieren, welche eine Struktur einnehmen können. Besonderes Gewicht bei der Auswertung der BCR-ABL mRNA Strukturanalyse wurde auf die Auswertung der Translokationsbruchbereiche gelegt. Für den b2a2 und den b3a2 Bruchpunkt wurden Strukturen von MFold vorhergesagt. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, daß Ribozyme, welche gegen den b3a2 Bruchpunkt gerichtet sind eine schlechte Zugänglichkeit besitzen (Kronenwett et al 1996).

Um die berechneten Strukturen mit experimentellen Daten abzusichern wurde der b2a2-Translokationsbereich durch verschiedene Mappingmethoden untersucht. Um zu Überprüfen wie die Konformation der Struktur ist, wurde RNasemapping mit ss- und ds-RNA spezifischen RNasen durchgeführt. Diese Methodik liefert bei kurzen RNA-Fragmenten aufgrund der Größe der verwendeten Enzyme nur eine grobe Struktur. Um diese Limitation zu umgehen, wurde dieser RNA-Bereich zusätzlich einem Mapping durch künstliche Nukleasen unterzogen. Diese kleinen chemischen Moleküle lösen die Struktur feiner auf als die RNasen.

Durch die Sekundärstrukturanalyse der bcr-abl mRNA durch MFold und dem Vergleich zwischen den errechneten und experimentellen Daten an einem Beispiel, wurde das erste notwendige Ziel, für eine RNA-Liganden Suche, erreicht. Es wurden Bereiche innerhalb der bcr-abl mRNA definiert, welche sich in Strukturen falten können. Diese Strukturen können nun als Zielstruktur einer Ligandensuche dienen.

Für eine weitere strukturelle Analyse der Konformation können chemische Mappingmethoden und NMR-Spektroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Es wurde im Rahmen der Arbeit versucht, die b2a2-RNA NMR-Spektroskopisch zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde ein Hammerheadribozym an die b2a2-RNA Sequenz angefügt. Auf diese Weise sollen definierte 3'-RNA Enden Produziert werden. Jedoch gelang es nicht, die RNA in der gewünschten Reinheit und Menge zu produzieren als daß man sie für NMR Spektroskopische Untersuchungen verwenden können.

Im Folgenden wurde das Phage Display System verwendet, um Peptidliganden für die verschiedenen RNA-Strukturen zu finden. Bei dieser evolutionären Strategie wird das Ziel verfolgt, durch serielle Selektionsschritte diejenigen Peptide zu finden, die präferentiell besser an dem Target binden können. Für diese Selektionsschritte war es notwendig, daß das exprimierte Peptid und die genetische Information für die Expression des Peptides in einem System vorhanden sind. Im Fall des Phage Displays sind dies Phagen. Aus diesem Grund ist es möglich, mehrere Selektionsrunden mit einem Startpool hintereinander durchzuführen, wobei der Selektionsdruck auf die Interaktion durch Konkurrenzselemente verändert werden kann. Der Startpool besitzt eine Diversität von etwa 10^9 unterschiedlichen Peptiden, die von den Phagen präsentiert werden. Bei dieser Herangehensweise selektioniert man den im Startpool besten Interaktionspartner heraus. Insofern spielt die Diversität des Startpools eine wichtige Rolle, ob man einen guten Liganden finden kann. Ein weiteres wichtiges Element sind die Selektionsrunden. Eine Selektionsrunde wurde hier in Lösung durchgeführt, wobei das Target nicht an einer Matrix fixiert war. Dies soll konformationelle Einflüsse auf die kurze RNA Struktur während der Bindung an die Matrix minimieren.

Für die verwendeten RNA-Strukturen sind keine natürlichen Interaktionspartner bekannt, so daß keine Konkurrenz mit dem natürlichen Interaktionspartner durchgeführt werden konnte. Statt dessen wurde zur Erhöhung des Selektionsdruckes ein zusätzlicher Konkurrenzschritt mit der Target-RNA durchgeführt, wobei diese kompetitor RNA die Möglichkeit der Bindung an die Säule fehlt.

Durch diese Methode wurden Peptidsequenzen für die unterschiedlichen RNA-Strukturen gefunden. Diese Peptide sollen nun die Möglichkeit besitzen, mit der jeweiligen RNA in Interaktion zu treten.

Durch die hier durchgeführten Selektionsprozesse konnten keine Konsensussequenzen, sondern nur komplett identische Peptid-Sequenzen isoliert werden. Eventuell besitzt die RNA verschiedene Bereiche, an denen Phagen-RNA Interaktion möglich ist. Man würde dann keine Konsensussequenz erhalten, sondern unterschiedliche Peptide, die mit der RNA an verschiedenen Punkten interagieren. Es wäre an dieser Stelle von Vorteil gewesen, wenn ein natürlicher Interaktionspartner mit der entsprechenden RNA-Struktur bekannt wäre. Dadurch wären Verdrängungsexperimente zwischen dem Phagen und dem natürlichen Liganden möglich gewesen, was die Spezifität der selektierten Phagen erhöhen sollte. Dadurch wäre es auch möglich gewesen den Bindungsort während der Selektion zu definieren; nämlich an der Stelle, an der auch der natürlich Ligand mit der RNA in Interaktion tritt. Man hätte diese Auswahl des Bindungsortes auch mit den b2a2-RNA-Struktur-Mutanten erreichen können, jedoch war zu diesem Zeitpunkt der Arbeit weder die Struktur charakterisiert, noch war die Interaktion nachgewiesen. Ein Problem bei Phage-Display allgemein sind die biologischen Effekte. Bei schlechten Ziel-Strukturen setzen sich schnell wachsende Phagen besser durch, als spezifisch bindende Phagen. Auch bei einem Proteinepitop setzten sich die schnellwachsenden Phagen mit zunehmender Zahl an Selektionsrunden gegenüber den selektiv bindenden Phagen durch. Weitere Probleme umfassen den Abbau von ungefalteten Molekülen, schlechte Expression im Host-Bakterium sowie fehlerhafte Prozessierung der Proteine auf die Phagenoberfläche. Eine mögliche Verbesserung in diesem Punkt bietet das mRNA-Display an. Bei dieser evolutionären Selektionsmethode reduziert sich der „biologische Anteil“ auf In-vitro-Transkription/Translation, Ligation sowie RT-PCR-Schritte. Auch die Diversität ist im Vergleich zum Phage Display um mehr als 4 Log-Stufen größer. Durch mRNA-Display kann eine Diversität von mehr als 10^{13} verschiedenen Peptidsequenzen erreicht werden, was dazu führt, daß auch mehr hochaffine Interaktionspartner enthalten sind. Bei diesem Ansatz ist das Peptid über Puromycin an die eigene genetische Information gebunden.

Durch das hier durchgeführte Phage-Display konnten zwei unterschiedliche Peptidsequenzen gefunden werden, die den b2a2 Translokationsbereich binden können.

Die Interaktionsspezifität der gefundenen Peptide wurde durch nichtkompetitive und kompetitive FCS-Experimente gezeigt. Bei diesen Experimenten bestimmt man die Diffusionszeit von markierten Molekülen in der Probe. Die Konzentration dieser Moleküle darf nicht zu niedrig sein, da diese sonst sehr selten an dem Meßpunkt vorbei diffundieren, die Konzentration darf aber auch nicht zu hoch sein, da einzelne Moleküle am Meßpunkt verfolgt werden müssen, um die Diffusionszeit zu ermitteln. Da Phagen ein Gewicht von etwa 5MDa besitzen, muß man bei einer Interaktion der fluoreszenzmarkierten RNA mit dem Phagen eine entsprechend langsame Diffusionszeit messen können. Dies wurde in dieser Arbeit gezeigt. Aus der Korrelationsfunktion konnte man die verschiedenen Populationen sowie die dazugehörigen Diffusionszeit erkennen. Insgesamt wurden 14 unterschiedliche Peptide durch FCS auf Interaktion hin untersucht. Lediglich bei zwei Peptiden konnte eine Interaktion detektiert werden. Theoretisch müßten alle 14 Phagen ein Signal durch die Interaktion mit der jeweiligen Target RNA hervorrufen können. Jedoch scheinen die kD-Werte der restlichen 12 Phagen höher und die Affinität geringer zu sein, als die den beiden Peptiden 12 und 14, so daß dieser geringe Anteil an Phagen-RNA-Komplexen nicht gemessen werden konnte.

Durch FCS konnten Peptide gefunden werden, die den b2a2 RNA Translokationsbereich spezifisch binden können. Eine weitere Charakterisierung dieser Interaktion erfolgte durch CD-Titrationsexperimente. Hier wurden die kD-Werte der Peptid-RNA Interaktion ermittelt und der Bindungsort der Peptide wurde beschrieben. Bei diesen Experimenten wurden RNA Mutanten abgeleitet, die aus dem hier ermittelten Strukturvorschlag stammen. Mit diesen mutierten b2a2-RNA Sequenzen konnte der Bindungsort der Peptide beschrieben werden. Während das 7mer Peptid 12 den oberen Loop und einen Teil des oberen Stammes für die Interaktion benötigt, so ist nur der untere Stamm für das 12mer Peptid 14 unwichtig. Um die Interaktionsstellen weiter aufzuklären können zusätzliche RNA-Mutanten generiert werden. Im Fall des Peptides 12 bietet es sich an, verschiedene RNA-Mutanten mit Punktmutationen im oberen Loop und oberen Stamm zu generieren und die Interaktion mit dem Peptid zu ermitteln. Dies kann auch durch NMR-Spektroskopische Untersuchungen an der wt-b2a2-RNA mit dem entsprechenden Peptid ergänzt werden. Hier würde man neben der Interaktionsstelle der Peptide auch die Sekundärstruktur der RNA aufklären können.

Betrachtungen der Peptide liefern auch schon einen möglichen Hinweis auf die Interaktionsart mit der RNA.

Auffälligstes Merkmal des 7mer Peptid 12 ist der symmetrische Aufbau. Zwischen zwei Lysinen am C- und N- Terminus reihen sich alternierend Histidine und Leucine an. Lysin und Histidin zählen zu den basischen Aminosäuren, so daß diese bei physiologischem pH-Wert positiv geladen sind. Mit dieser positiven Ladung können diese Aminosäuren mit dem negativ geladenen RNA Rückgrat interagieren. Die Spezifität der Bindung kommt dabei durch die räumliche Anordnung der an der Bindung beteiligten Gruppe zustanden. Eine Datenbanksuche liefert darüber hinaus Homologien zu der Familie der fhit-Proteine, welche Nukleinsäuren binden können. Diese Proteine besitzen am katalytischen Zentrum eine Histidintriade, ähnlich wie bei diesem Peptid.

Ebenso, wie die RNA mutiert werden kann, um zu erfahren, wo die Interaktion statt findet, kann das Peptid verändert werden, um eine optimierte Bindung an die RNA zu ermöglichen. So könnte man interkalierende Gruppen einfügen und die Interaktionsstärke dieser neuen Peptide mit den alten vergleichen. Hilfreich sind hierbei natürlich Informationen, aus denen hervorgeht, welche Gruppen notwendig für die RNA-Interaktion sind, sowie die räumliche Anordnung dieser Gruppen.

Die beschriebenen Methoden haben zum Ziel, mehr Information über RNA-Liganden-Interaktion zu gewinnen. Dieses Wissen kann dann dazu genutzt werden, aus Peptiden bioverfügbare Medikament zu machen. Am Anfang dieses Prozesses steht auch die Überprüfung, ob die gefundenen Substanzen einen gewünschten biologischen Effekt besitzen.

Die biologische Aktivität der hier gefundenen Peptide 12 und 14 wurde durch In-vitro-Translationsexperimente ermittelt. Diese konnten eine spezifische, signifikante Abnahme der Reporterluziferase-Aktivität, um einen Faktor von etwa 50 gemessen werden. Auch konnte hier indirekt das Vorhandensein der b2a2 Struktur beobachtet werden. Das verwendete Transkriptions/Translations-System ist empfindlich auf jede Struktur im 5'-UTR Bereich. Im direkten Vergleich zwischen dem wt-Reporter- sowie dem b2a2-Reporterluziferase-konstruktes konnte allein durch die b2a2-Sequenz eine Reduktion der Luziferaseaktivität beobachtet werden. Dies deutet auf eine Struktur hin, welche auch im Kontext einer längeren RNA von dem Peptid gebunden werden kann. Es ist hier auch zu beobachten, daß bei der Verwendung der b2a2-RNA Mutante 5 eine Abnahme der Luziferaseaktivität in Gegenwart des Peptides 14 zu beobachten ist. Diese Abnahme ist jedoch nicht so stark, wie bei der Verwendung der b2a2-wt-RNA. Bei der Mutante 5 war der untere Stamm teilweise deletiert. In den CD-Experimenten zeigte das Peptid 14 bis zu einer Konzentration von 84 µM keine Bindung an diese Mutanten-RNA. Im Fall des Luziferase-Assays wurde mit einer Peptidkonzentration von 1mM gearbeitet. Es scheint so zu sein, daß das Peptid an unterschiedlichen Stellen mit der RNA interagiert, wobei bei einer höheren

Peptidkonzentration auch solche RNA-Strukturen gebunden werden können, die nicht komplett mit der eigentlichen Ziel-RNA übereinstimmen.

Um die Aktivität der Peptide weiter zu untersuchen ist es notwendig, diese in der Zellkultur zu testen. Als Zellen müssen leukämische Zellen mit der BCR-ABL-Translokation b2a2 verwendet werden. Um die Peptide in die Zelle zu bringen, stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Wenn man die Funktionsweise der Peptide experimentell untersuchen möchte, so kann man diese durch Mikroinjektion oder Elektroporation direkt in die Zellen bringen. Ebenso ist es möglich die Peptidsequenz in ein Genkonstrukt einzufügen und dieses durch Transfektion oder viraler Infektion in die Zelle zu schleusen. Es folgt dann die Transkription und Translation in der Zelle. Hier wird der therapeutische Wert jedoch dadurch gemindert, daß jede transformierte Zelle das Genkonstrukt aufnehmen muß, damit diese Therapie erfolgreich sein kann. Um diese Limitation zu umgehen, können die Peptide an PT-Domänen (peptide translocation domain) gekoppelt werden. Diese Domänen bestehen zu einem großen Teil aus basischen Aminosäuren und können die Zellmembran durchdringen. Entdeckt hat man dieses Verhalten 1988 bei dem HIV TAT Protein. Später konnte die minimal notwendige Sequenz bei TAT ermittelt werden, die für die Translokation der Membran notwendig ist (YGRKKRRQRRR). Unterschiedlich große Proteine (von 15 bis 120 kDa) wurden mit dieser TAT-PTD versehen und konnten durch die Domäne in die Zelle aufgenommen werden. Eine weitere PTD ist das Antennapedia Protein aus *Drosophila*. Die minimal notwendig Sequenz (RQIKIWFQNRRMKWKK) findet sich hier in der dritten Helix dieses Homeoproteines mit dem charakteristischen Helix-Turn-Helix-Motiv. Die Translokation bei diesen Domänen läuft bei unterschiedlichen Temperaturen ab und ist nicht sättigbar. Was zu der Annahme verleitet, daß dieser Vorgang nicht Rezeptor- oder Transportervermittelt ist. Man geht davon aus, daß die Translokation in mehreren Phasen verläuft. Zunächst findet eine elektrostatische Interaktion zwischen den basischen Aminosäuren und der negativ geladenen Zelloberfläche statt. Anschließend erleichtern die hydrophoben Aminosäuren die Translokation.

Wenn die Peptide in der Zelle dann die Physiologie der BCR-ABL-mRNA verändern, wird in besten Fall das Wachstum der Zellen verringert und Apoptose wird induziert. Falls die Peptide alleine keinen Effekt in der Zelle auf die Physiologie der BCR-ABL mRNA besitzen, so kann mit dem Peptid ein Konjugat synthetisiert werden. Bei diesem Konjugat ist das Peptid für die Erkennung der RNA-Struktur zuständig, während eine Effektor-Domäne z. B. in Form von künstlichen Nukleasen zuständig für die Degradation der Ziel-RNA ist.

Ein solches Vorgehen wurde auf Proteinebene am Beispiel der erbB2-RTK gezeigt. Hier wurden erbB2 spezifische Antikörper mit einem Toxin kombiniert. Bindung des Antikörpers an die Zielstruktur bringt das Toxin in die Nähe der transformierten Zelle und internalisiert dieses durch Endozytose, wo es schließlich im Zytosol aktiv wird (Altenschmidt et al 1997).

Ein ähnliches Vorgehen ist auch durch die Expression von Intrabodies intrazellulär möglich. Diese Intrabodies können im Zytosol ihr Ziel binden und auf diese Weise in ihrer Funktion des Ziels verändern. So wurde z.B. ein anti TAT sFV Intrabodies dazu verwendet das TAT-Protein im Zytosol anzureichern und auf diese Weise die Transaktivierung von tar durch TAT im Kern zu verhindern (Rondon et al 1997). Diese Intrabodies in Kombination mit unterschiedlichen Signaldomänen wie SOCS-Box, Kernlokalisierungssignalen u.a. können dann dazu verwendet werden das jeweilige Target zum Proteasom oder in den Kern zu lokalisieren.

Im Rahmen der Behandlung von Ph⁺ Leukämien wurden in den letzten Jahren, nicht zuletzt durch den Tyrosinkinaseinhibitor SFT571, beachtliche Erfolge erzielt. Die schnelle Resistenzentwicklung der Zellen gegen STI macht es jedoch notwendig nach alternativen Therapien zu suchen. Eine mögliche Alternative für diese Art von Krankheiten, deren Ansatz in dieser Arbeit verfolgt wurde, ist die Verwendung von niedermolekularen Substanzen, welche auf RNA-Ebene angreifen. Um die Resistenzentwicklung zu erschweren und um einen besseren Effekt als mit den einzelnen Substanzen zu erzielen, bietet sich eine Kombinationstherapie von RNA-Liganden und STI 571 an.

5 Zusammenfassung

Die reziproke Translokation t(9;22) ist in 95% der chronischen myeloischen Leukämie vorhanden. Bei der Translokation entsteht ein Fusionsprotein BCR-ABL, welches ausreichend für die Entstehung von Leukämien ist. 30% aller akuten lymphatischen Leukämien sind ebenfalls positiv für diese Translokation. Durch die Translokation entsteht am Translokationsbruchpunkt eine einzigartige RNA-Sequenz, welche als Ziel für eine RNA-Liganden Suche dienen kann. Ziel dieser Arbeit war es, Peptidliganden zu finden, welche die BCR-ABL mRNA binden können.

Zunächst wurde die bcr-abl mRNA nach Sekundärstruktur-Elementen durchsucht, welche als Interaktionspartner mit Peptiden in Frage kommen. Hierzu wurde die BCR-ABL mRNA durch das MFold-Programm von Zuker analysiert. Durch die Auswertung der errechneten Diagramme für die thermodynamische Stabilität und die kinetische Prävalenz der Basenpaarinteraktion, wurden zehn verschiedene BCR-ABL mRNA-Bereiche ausgewählt, welche die Möglichkeit besitzen, sich in stabile Sekundärstruktur-Elemente zu falten. Um diese strukturellen Gegebenheiten am BCR-ABL Translokationsbruchpunkt b2a2 im Experiment zu überprüfen, wurden in Kooperation mit Prof. Göbel und Dr. Scheffer RNase-Mapping und Mapping mit einer künstlichen Nuklease durchgeführt. Es konnte im Experiment das Vorhandensein einer Sekundärstruktur nachgewiesen werden. Diese Struktur wird aus einem Stamm mit einer Fehlpaarung, einem asymmetrischen internen Loop, einem weiteren Stamm und durch einen Loop definiert.

Gegen diese b2a2-Struktur und gegen neun weitere mRNA-Bereiche wurde eine Phage-Display-Selektion durchgeführt, welche zum Ziel hat, Peptide zu gewinnen, welche die entsprechende RNA-Struktur spezifisch binden können. Nach der Sequenzierung der Phagen, konnten insgesamt 14 verschiedene Peptid-Sequenzen für die zehn unterschiedlichen RNA-Bereiche gefunden werden, welche die Möglichkeit besitzen, mit der jeweiligen Ziel-RNA zu interagieren.

Die Phagen-RNA Interaktion wurde durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ermittelt. Bei dieser Meßmethode werden Diffusionszeiten von markierten Molekülen in Lösung bestimmt. Zwei von den 14 Phagen-Präsentierten-Peptiden zeigen eine Interaktion mit der Ziel RNA. Die gefundenen Peptide besitzen die folgenden AS-Sequenz: das Peptid 12, KHLHLHK und das Peptid 14, NPEKVKMLYVEF. Die Interaktion mit der RNA wurde in nicht kompetitiven und in kompetitiven FCS Experimenten gezeigt. Kompetiert wurde die Phagen-RNA Interaktion mit kompetitor RNA und in einem weiteren Experiment mit den synthetisierten Peptiden.

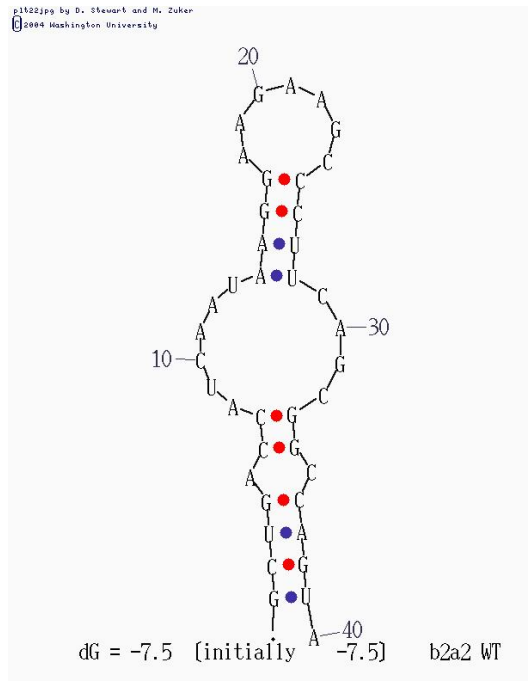
Beide Peptide zeigten im FCS eine Interaktion mit dem b2a2 BCR-ABL Translokationsbruchpunkt. Die K_D -Werte der Peptid-RNA Interaktion wurde durch CD-Titration ermittelt. Peptid 12 bindet die b2a2-RNA mit einem K_D -Wert von 42 μ M und Peptid 14 bindet diese RNA mit einem K_D -Wert von 52 μ M. Durch die CD-Titration wurde auch der Interaktionsort der beiden Peptide mit der b2a2-RNA ermittelt. Ausgehend von unserem b2a2-Strukturmodell, wurden RNA-Mutanten generiert und in Gegenwart von den Peptiden CD-Spektrometrisch untersucht. Die Interaktion von Peptid 12 mit der RNA findet am Loop und am oberen Stamm statt. Das längere Peptid 14 benötigt alle b2a2-RNA Strukturmerkmale, außer dem unteren Stamm, zur Interaktion.

Der Einfluß der Peptide auf die Translation wurde durch ein In-vitro-Translationssystem ermittelt. Demnach bindet Peptid 14 an die b2a2-RNA-Struktur und verringert auf diese Weise die Translation. Peptid 12 bindet zwar ebenfalls an die b2a2-RNA, jedoch konnte eine Verringerung der Translation bei diesem Peptid nicht beobachtet werden.

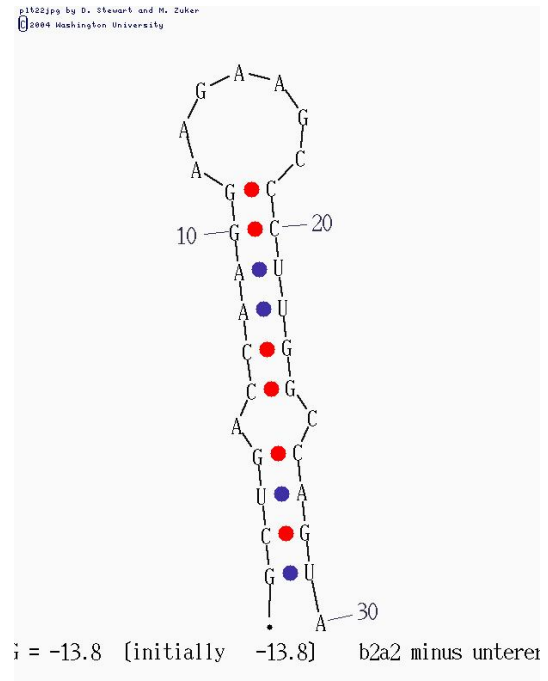
Anhang

Anhang I Mfold Faltungen der b2a2-RNA Mutanten

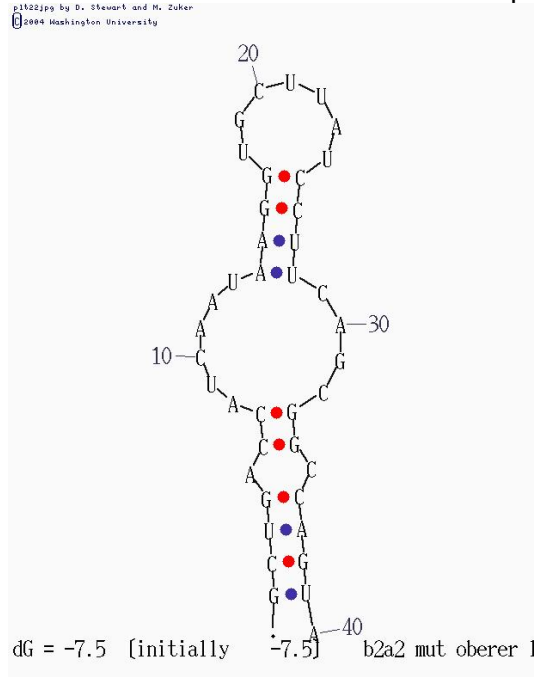
B2a2 Wildtyp



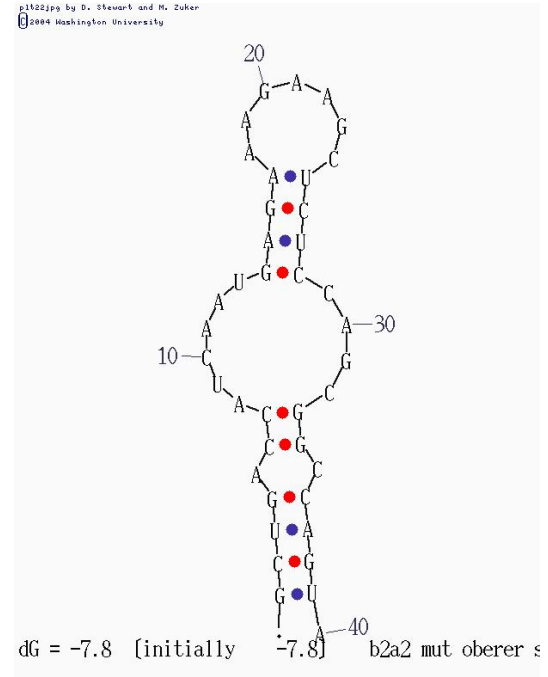
B2a2 Mutante 1 – Deletion unterer Loop



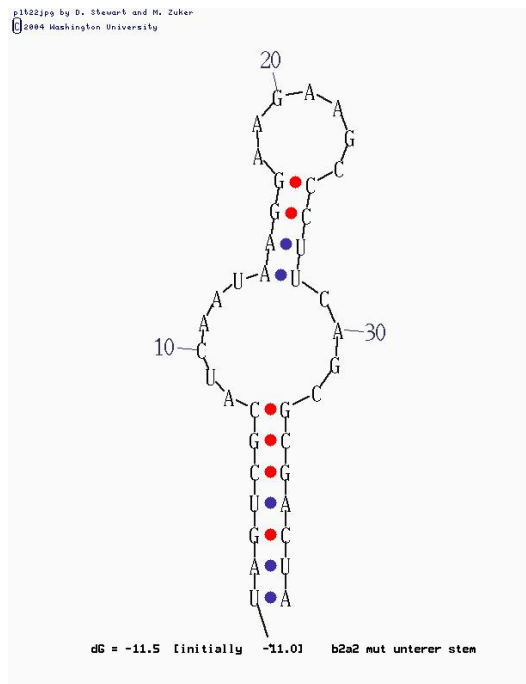
B2a2 Mutante 2 – Mutation oberer Loop



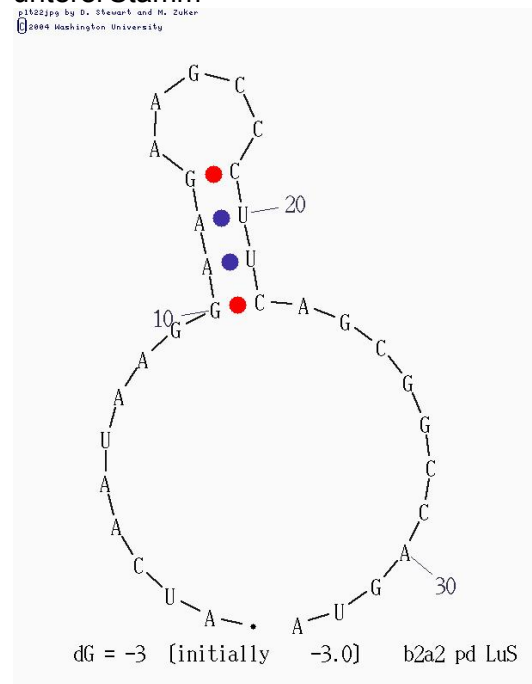
B2a2 Mutante 3 – Mutation oberer Stamm



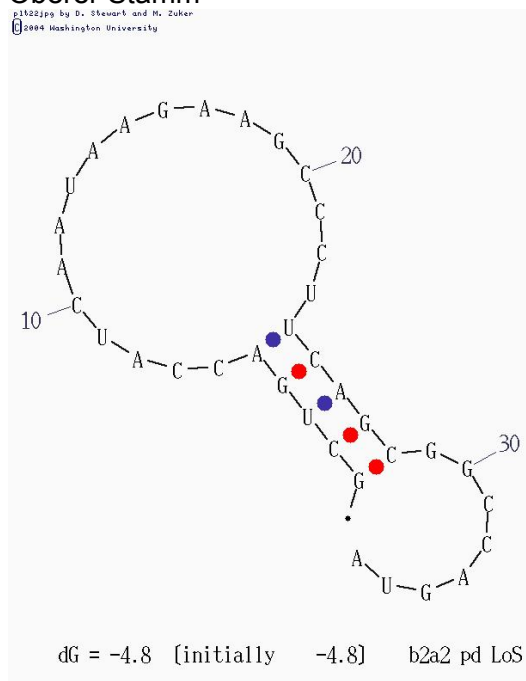
B2a2 Mutante 4 – Mutation unterer Stamm



B2a2 Mutante 5 – Partielle Deletion unterer Stamm



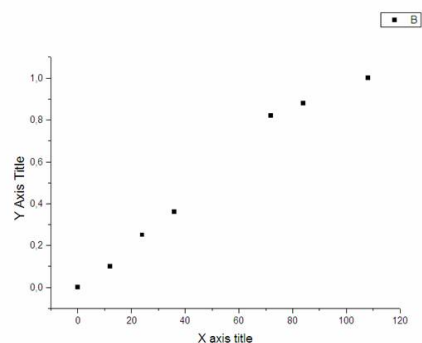
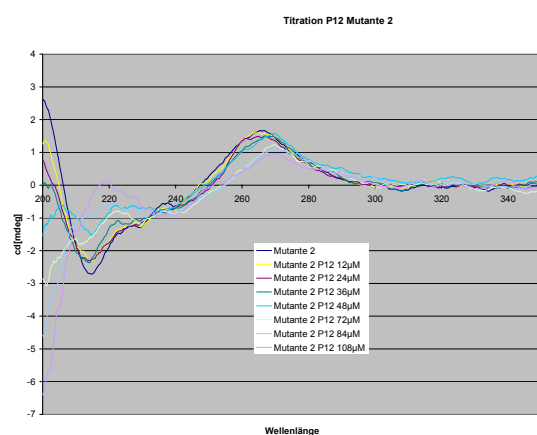
B2a2 Mutante 6 – Partielle Deletion Oberer Stamm



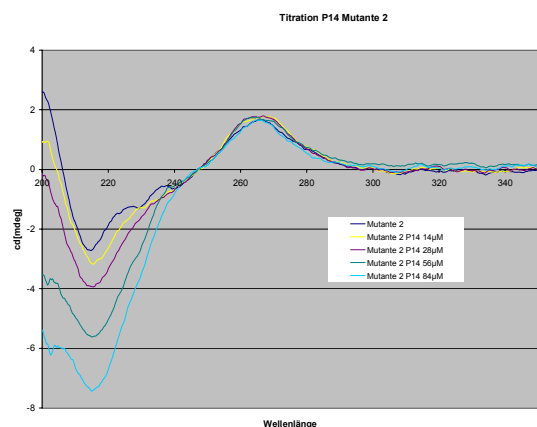
Anhang II CD-Spektren der RNA Mutanten und der Titration der Peptide 12 und 14

Wenn es zu einer Veränderung der Meßwerte während der Titration kommt, wurden diese entsprechend dargestellt. Auf eine Boltzmann-Transformation wurde verzichtet, wenn der Punkteverlauf linear verlief und es keinen Hinweis auf zwei verschiedene Populationen zu erkennen war.

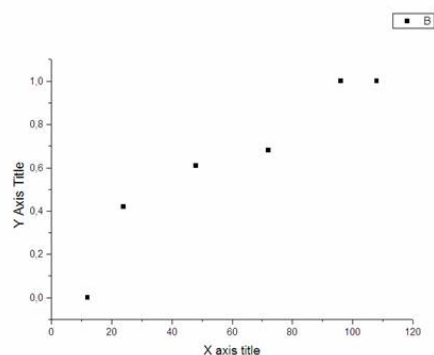
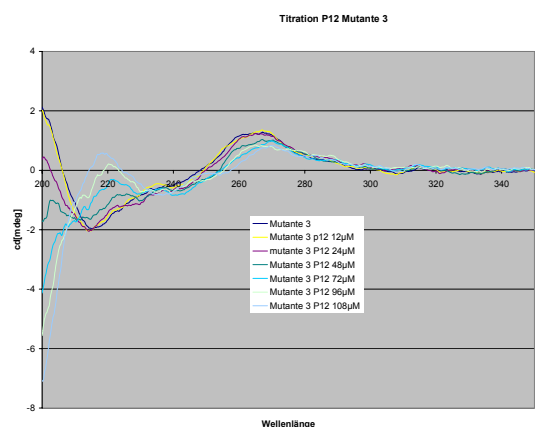
P12 Mutante 2



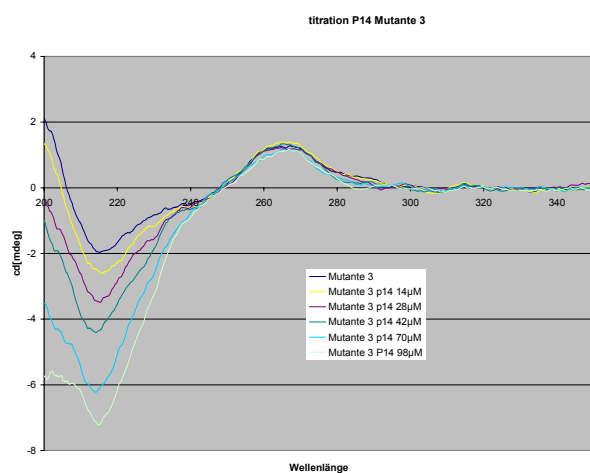
P14 Mutante 2



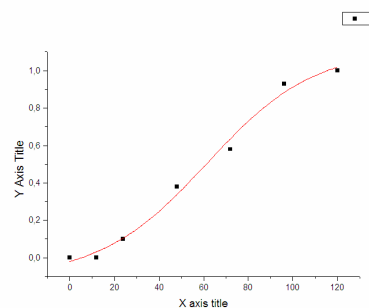
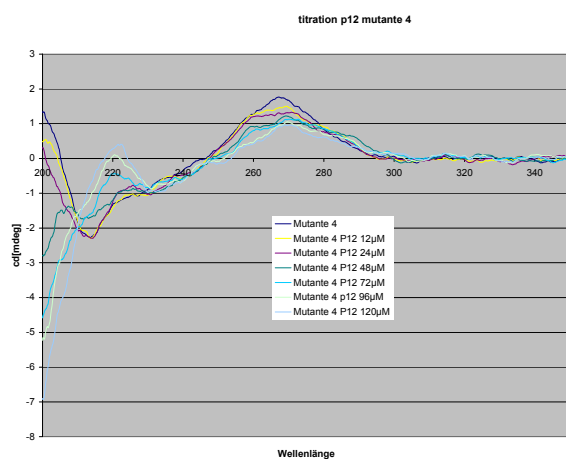
P12 Mutante 3



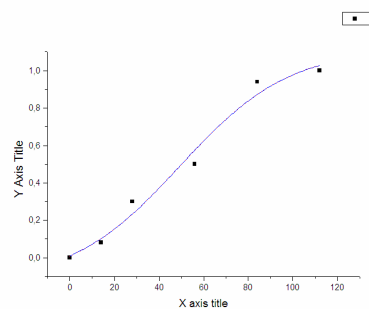
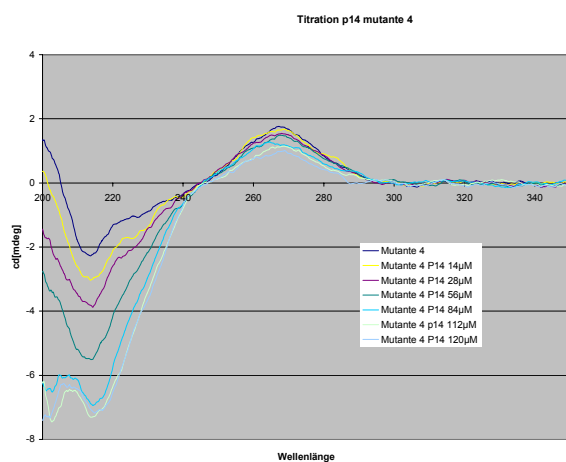
P14 Mutante 3



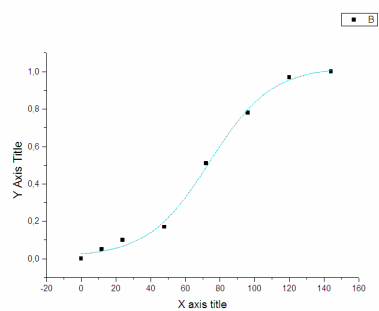
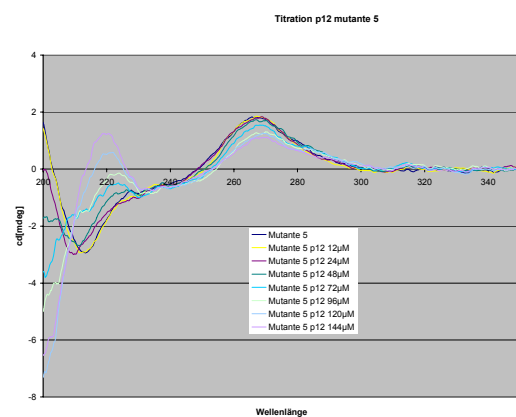
P12 Mutante 4



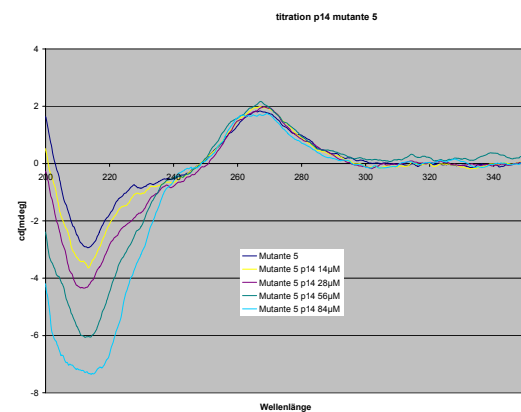
P14 Mutante 4



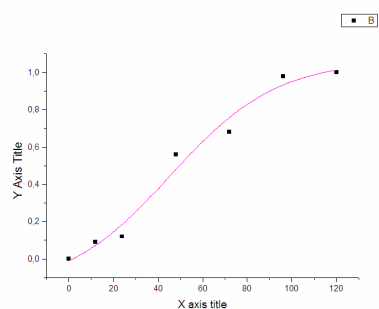
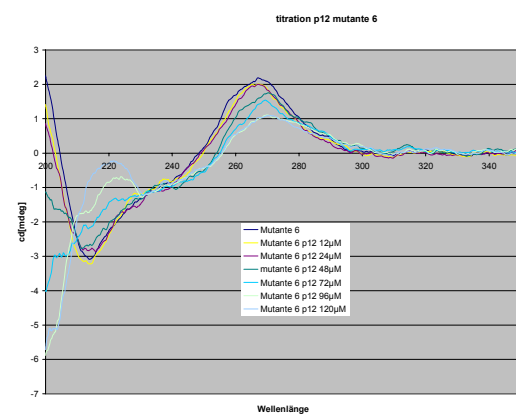
P12 Mutante 5



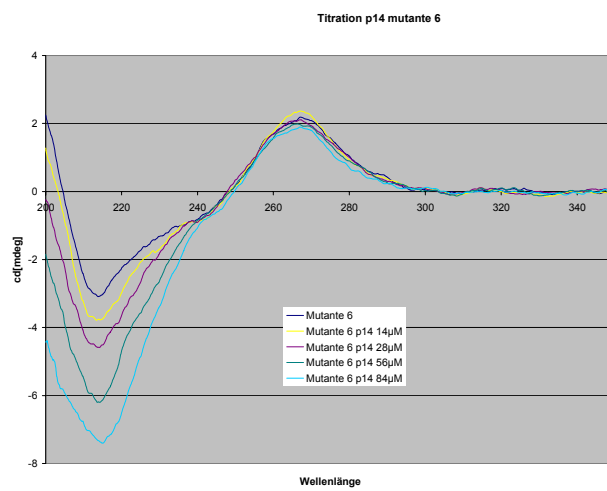
P14 Mutante 5



P12 Mutante 6



P14 Mutante 6



Literaturverzeichnis

Abdelgany, e. a. (2003). "Allele specific silencing of a pathogenic mutant acetylcholine receptor subunit by rna1." Hum.Mol.Genet **12**: 2637.

Achenbach, e. a. (2003). "Oligonucleotide-Based Knockdown Technologies: Antisense versus RNA interference." ChemBioChem **4**: 928.

Agris, P. F. (1999). "Experimental Models of Protein-RNA Interaction: Isolation and Analyses of tRNA^{phe} and U1 snRNA-Binding Peptides from Bacteriophage Display Libraries." Journal of Protein Chemistry **18**(4): 425-435.

Ahsen, e. a. (1991). Nature **353**: 368.

Alan Sachs, P. S., Matthias Hentze (1997). "Starting at the Beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes." Cell **89**: 831-838.

Altenschmidt U., e. a. (1997). "Targeted therapy of schwannoma clees in immunocompetent rats with san erbB2-specific antibody-toxin." Int. J. Cancer **73**: 117

Ambros, e. a. (2003). "MicroRNA pathways in flies and worms." Cell **113**: 673.

Ambros, V. (2001). "microRNAs: Tiny regulators with great potential." Cell **107**: 823-826.

Anissa N. Elayadi, A. D., Edward V. Wnacewicz, Brett P. Monia and David R. Corey (2001). "Inhibition of telomerase by 2'-O-(2-methoxyethyl)RNA oligomers: affect of length, phosphorothioate substitution and time inside cells." Nucleic Acids Research **29**(8): 1683-1689.

Antal, M. (2002). "Analysis of the structure of human telomerase RNA in vivo." Nucleic Acids Research **30**(4): 912-920.

Aparicio S, e. a. (2002). "Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *fugu rubripes*." Science **297**: 1301.

Asish Xavier, P. E., Tony Giordano (2000). "RNA as a drug target: methods for biophysikal charakterisation and screening." TIBTECH **18**: 349-355.

Aufsatz, e. a. (2002). "RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis." Proc.Natl.Acad.Sci **99**: 16499.

Baker, e. a. (1997). "2'-o-82-methoxyethyl-modified anti-intracellular adhesion molecule 1 oligonucleotides selectively increase the icam 1 mrna level." J.Biol-Chem **272**: 11994.

Baldwin, R. L. (2002). "Making a Network of Hydrophobic Clusters: protein Folding." Science **295**: 1657-1658.

Barrick, J. E. (2001). "Large libraries reveal diverse solutions to an RNA recognition problem." PNAS **98**(22): 12374-12378.

Bartel, e. a. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**: 281.

Bass, B. (2001). "The short answer." Nature **411**: 428-429.

Belsham, I. A. S. a. G. J. (2001). "A novel protein-RNA binding assay: Functional interactions of the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site with cellular proteins." RNA **7**: 114-122.

Bertand, e. a. (1997). "The expression cassette determines the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization." RNA **3**: 75.

Biliang Zhang, Z., and Lele Sun (2000). "Synthesis of 5'-Deoxy-5'-thioguanosine-5'-monophosphorothioate and its incorporation into RNA 5'-termini." Organic Letters **3**(4): 275-278.

Bridge, e. a. (2003). "Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells." Nature **34**: 263.

Bruce A. Sullenger, E. G. (2002). "emerging clinical applications of RNA." Nature **418**: 252-258.

Buckingham, S. (2003). "The major world of micro RNAs." Nature.

Bussemakers, e. a. (1999). "DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer." cancer res **59**: 5975.

Carl Novina, M. M., Derek Dykxhoorn, Paul Beresford, Jonathan Riess, Sang-Kyung Lee, Ronald Collman, Judy Lieberman, Premkumar Shankar, Phillip Sharp (2002). "siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection." Nature.

Carrington, e. a. (2003). "Role of microRNAs in plant and animal development." Science **301**: 336.

Catovsky D, e. a. (1979). "Ph-1 positive acute leukaemia and chronic granulocytic leukaemia: one or two diseases?" Brit J Haematol **42**: 493.

Chan LC, e. a. (1987). "A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia." Nature **325**: 635.

Chatchawan Srisawat, D. E. (2001). "Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins." RNA **7**: 632-641.

- Chen, J.-L. (2000). "Secondary Structure of vertebrate Telomerase RNA." Cell **100**: 503-514.
- Chen, J.-L. (2001). "A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA." Nucleic Acids Research **30**(2): 592-597.
- Chen, X. (2003). "a microRNA as a translational repressor of APETALA2 in arabidopsis flower development." Science.
- Chi-hong Chen, L. M., Ralf Landgraf, David Perrin, David Sigman (2001). "Artificial Nucleases." ChemBioChem **2**: 735-740.
- Chirinos-Rojas (1999). "A phage-displayed mimotope inhibits tumor necrosis factor alpha induced cytotoxicity more effectively than the free mimotope." Immunology **96**: 109-113.
- Cho, G. (2000). "Construction High complexity Synthetic Libraries of long ORFs Using In vitro Selection." JMB **297**: 309-319.
- Clark SS, e. a. (1987). "Unique forms of the abl tyrosine kinase distinguish Ph1-positive CML from Ph1-positive ALL." Science **235**: 85.
- Clever, J. (1995). "RNA Secondary Structure and Binding Sites for gag Gene Products in the 5' Packaging Signal of Human Immunodeficiency Virus Type 1." Journal of Virology: 2101-2109.
- Clodi, E. (1999). "Assaying RNA chaperone activity in vivo using a novel RNA folding trap." EMBO **18**(13): 3776-3782.
- Cole, C. (2000). "mRNA export: the long and winding road." Nature **2**: E55-E58.
- Collins, J. (2001). "Evolutionary Phage-display - a Method as Basis for a Company."
- Consortium, H. G. S. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**: 860.
- Corner AR, e. a. (1995). "Can the clues to the molecular defects in chronic myelogenous leukaemia come from genetic studies on the abelson tyrosine kinase in fruit flies?" J Lab Clin Med **125**: 686.
- Croft L., e. a. (2003). "Is prokaryotic complexity limited by accelerated growth in regulatory overhead?" Genome Biol.Preprint Depository
<http://genomebiology.com/qc/2003/5/1/p2>.
- Daley G.Q., e. a. (1990). "Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210 BCR/ABL gene of philadelphia chromosome." Science **247**: 824.
- Daniels, D. A. (1996). "Phage Peptide Libraries." Methods **9**: 494-507.

- Danilo Perotti, B. c. (2002). "Post-transcriptional mechanisms in BCR/ABL leukemogenesis: role of shuttling RNA-binding proteins." Oncogene **2002**(21).
- Danner, S. (2001). "T7 phage display: A novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries." PNAS **98**(23): 12954-12959.
- David S. Bernstein, N. B., Craig Stumpf, Marvin Wickens (2002). "analysing mRNA-protein complexes using a yeast three-hybrid system." Methods **26**: 123-141.
- David Wilson, A. K., Jack Szostak (2001). "The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides." PNAS **98**(7): 3750-3755.
- de Fabritiis, e. a. (1007). "Effect of bcr-abl oligodesoxynucleotides on the clonogenic growth of chronic myelogenous leukemia cells." Leukemie **11**: 811.
- de Fabritiis, e. a. (1993). "elimination of clonogenic Philadelphia-positive cells using BCR-ABL antisense oligodesoxynucleotides." Bone Marrow Transplantation **12**: 261.
- de Fabritiis, e. a. (1998). "BCR-ABL Antisense Oligodeoxynucleotide in Vitro purging and autologous bone marrow transplantation for patients with chronic myelogenous leukemia in advanced phase." Blood **9**: 3156.
- Deikmann D, e. a. (1991). "Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac." Nature **351**: 400.
- del Solar , e. a. (2000). "Plasmid copy number control: an ever growing story." Mol.Microbiol **37**: 492.
- Dennis Wang, B. L., Anat Feldman, Dipankar Sen (2002). "A general approach for the use of oligonucleotide effectors to regulate the catalysis of RNA-cleaving ribozymes and DNAzymes." Nucleic Acids Research **30**(8): 1735-1742.
- Ding, e. a. (2003). "Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis." Aging Cell **2**: 209.
- D'Mello, F. (2001). "an improved selection procedure for the screening of phage display peptide libraries." Journal of Immunological Methods **241**: 191-203.
- Dorsett, e. a. (2004). "siRNAs: application in functional genomics and potential as therapeutics." Nature **3**: 318.
- Doudna, e. a. (2002). "The chemical repertoire of natural ribozymes." Nature **418**: 222.
- Drebin, J. A., et al (1984). "Monoclonal antibodies identify in a cell surface antigen associated with an activated cellular oncogene." Nature **312**: 545.
- Drew, e. a. (1999). "RNA hairpin loops repress protein synthesis more strongly than hammerhead ribozymes." Eur.J.Biochem. **266**: 260.

Eckstein, e. a. (2000). "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them?" Antisense Nucleic Acid Drug Dev **10**: 117.

Eddy (2001). "non-coding rna genes and the modern rna world." Nature **2**: 919.

Eddy, S. R. (2001). "Non-coding RNA genes and the modern RNA world." Nature **2**: 919-929.

Elbashir, e. a. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate interference in cultured mammalian cells." Nature **411**: 494.

Elbashir, e. a. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes.Dev. **15**: 188.

Elena a. Lesnik, R. S., David J. Ecker (2002). "Rev Response Elements in Lentiviruses : an RNA Motif algorithm-based strategy or RRE prediction." Medical Research **22**(6): 617-636.

Erwei Song, S.-k. L., Jie Wang, Nedim Ince, Nengtai Ouyang, Jun Min, Jisheng Chen, Premalata Shankar & Judy Lieberman (2003). "RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis." Nature.

Fagard, H. V. a. M. (2001). "Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators." trends in genetics **17**(1): 29-35.

Fendly, B. M., et al (1990). "Characterization of murine monoclonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor receptor or HER2/neu gene product." cancer res **50**: 1550.

Ferrara, e. a. (2004). "Discovery and development of bevacizumab an anti-vegf antibody for treating cancer." Nature **3**: 391.

Finger L.R., e. a. (1986). "A common mechanism of chromosomal translocation in T and B cell neoplasia." Science **234**: 982-985.

Fire, A. (1999). "RNA-triggered gene silencing." TIG **15**(9): 358-363.

Flamm, C. (2000). "RNA folding at elementary step resolution." RNA(6): 325-338.

Francois bachand, I. T., Chantal Autexier (2001). "Human telomerase RNA-protein interactions." Nucleic Acids Research **29**(16): 3385-3393.

Francois Hamy, E. f., Gerhard heizmann, Janis Lazdins, Fareed Aboul-Ela, Gabriele Varani, Jonathan Karn, Thomas Klimkait (1997). "an inhibitor of the tat/tar rna interaction that effectively suppresses hiv-1 replication." PNAS **94**: 3548-3553.

Frankel, A. D. (2000). "Fitting peptides into the RNA world." Current Opinion in Structural Biology **10**: 332-340.

- Friedman, A. (2002). "Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development." Oncogene **21**: 3377-3390.
- Friesen, W. J. (1997). "Phage Display of RNA Binding Zinc Fingers from Transcription factor IIIA." The Journal of Biological Chemistry **272**(17): 10994-10997.
- Friesen, W. J. (1998). "Specific RNA binding proteins constructed from zinc fingers." Nature Structural Biology **5**(7): 543-546.
- Fukuhara S., e. a. (1979). "Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic leukemia." cancer res **39**: 3119-3128.
- Gagen M.J., e. a. (2004). "Failed nonaccelerating models of prokaryote gene regulatory networks." arXiv preprint archive <http://arxiv.org/abs/q-bio.MN/0312022>.
- Gagen M.J., e. a. (2004). "Inherent size constraints on prokaryote gene networks due to accelerating growth." arXiv preprint archive <http://arxiv.org/abs/q-bio.MN/0312021>.
- Gambacorti_passerini, e. a. (2000). "Role of α_1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571." Natl.Cancer Inst. **92**: 1641.
- Gambacorti_passerini, e. a. (2001). "Sensitivity to the abl inhibitor STI571 in fresh leukaemic cells obtained from chronic myelogenous leukaemia patients in different stages of disease." Br.J.Haematol **112**: 972.
- Gavory, G. (2002). "Minimum length requirement of the alignment domain of human telomerase RNA to sustain catalytic activity in vitro." Nucleic Acids Research **30**(20): 4470-4480.
- Geoffrey werstuck, M. G. (1998). "Controlling gene expression in living cells through small molecule - RNA interactions." Science **282**: 296-298.
- Geschwind, e. a. (2004). "The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy." Nature **4**: 361.
- Gilboa (2004). "The promise of cancer vaccines." Nature **4**: 401.
- Gold, L. (2001). "mRNA display: Diversity matters during in vitro selection." PNAS **98**(9): 4825-4826.
- Gonzales-Alegre, e. a. (2003). "Toward therapy for DYT1 dystonia." Ann.Neurol **53**: 781.
- Good, e. a. (1997). "Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei." Gene Therapy **4**: 45.
- Gottesmann, e. a. (2002). "Multidrug resistance in cancer: role of atp-dependent transporters." Nature **2**: 48.

Grewal, e. a. (2003). "Heterochromatin and epigenetic control of gene expression." Science **301**: 798.

Grishok, e. a. (2001). "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the temporal mRNAs that control C. elegans developmental timing." Cell **106**: 23.

Groffen J., e. a. (1984). "Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, BCR on chromosome 22." Cell **36**: 93-99.

Grunweller, e. a. (2003). "A comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioate and small interfering RNA." NARS **31**: 3185.

Guido Marcucci, D. P., Michael Caligiuri (2003). "Understanding the molecular basis of imatinib mesylate therapy in chronic myelogenous leukemia and the related mechanisms of resistance." Clinical Cancer Research **9**: 1248-1252.

Guido Zaman, P. M., Constant van Boeckel (2003). "Targeting RNA: new opportunities to address drugless targets." DDT **8**(7): 297-306.

Hall (2004). "Unravelling the general properties of siRNAs: strength in numbers and lessons from the past." Nature **5**: 552.

Hall, K. (2002). "RNA-protein interactions." Current Opinion in Structural Biology **12**: 283-288.

Hamy, e. a. (1997). "An inhibitor of the tat/tar RNA interaction that effectively suppresses HIV-1 replication." Proc.Natl.Acad.Sci **94**: 3348.

Hannon, e. a. (2002). "RNA interference." Nature **418**: 244.

Hantschel, e. a. (2004). "regulation of the c-abl and bcr-abl tyrosine kinases." Nature **5**: 33.

Harada, K. (1996). "Selection of RNA-binding peptides in vivo." Nature **380**(14): 175-179.

Harada, K. (1997). "Molding a peptide into an RNA site by in vivo peptide evolution." PNAS **94**: 11887-11892.

Harborth, e. a. (2001). "Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs." J.Cell.Sci. **114**: 4557.

Harvey, e. a. (2002). "inhibition of translation by RNA-small molecule interaction." RNA **8**: 452.

Hatano, M., et al (1991). "Deregulation of a homeobox gene HOX11 by the t(10;14) in T cell leukemia." Science **253**: 79.

He, e. a. (2004). "MicroRNAs: small rnas with a big role in gene regulation." Nature **5**: 522.

Hegener (2002). "Benzodiazepine binding studies on living cells: application of small ligands for fluorescence correlation spectroscopy." Biol Chem **383**(11): 1801-1807.

Hink, M. A., T. Bisselin, et al. (2002). "Imaging protein-protein interactions in living cells." Plant Mol Biol **50**(6): 871-83.

Hommel, e. a. (2003). "Local knockdown in the brain using viral-mediated RANi." Nature **9**: 1539.

Honegger, A. M., et al (1987). "A mutant epiderman growth factor receptor with defective protei tyrosine kinase is usable to stimulate proto-oncogene expression and DNA synthesis." Mol.Cell.Biol. **7**: 4568.

Honegger, A. M., et al (1987). "Point mutation at the ATP binding site of EGF receptor abolishes protein-tyrosine kinase activity and alters cellular routing." Cell **51**: 199.

Horace R.Drew, D. L., Jason Conaty, Keith Rand, Philip hendry, Trevor Lockett (1999). "RAN haipin loops repress protein synthesis more strongly than hammerhead ribozyme." FEBS **266**: 260-273.

Hua Shi, B. h., John Lis (1999). "RNA aptamers as effective protein anatagonists in a multicellular organism." PNAS **96**: 10033-10038.

Huang M., e. a. (2002). "Inhibition of-Bcr-Abl kinase activity by PD180970 blocks constitutive activation of STAT5 and growth of CML cells." Oncogene **21**: 8804.

Hudziak, R. M., et al (1989). "p185 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor." Mol.Cell.Biol. **9**: 1165.

Hutvanger, e. a. (2001). "a cellular function for the RNA interference enzyme dicer in the maturation of the let-7 small temporal rna." Science **293**: 834.

Isabelle Harvey, P. G., Jerry Pelletier (2002). "Inhibition of translation by RNA- small molecule ineractions." RNA **8**: 452-463.

Jackson P, e. a. (1989). "N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated from of c-abl." EMBO **8**: 449.

Jaeger, J. A. (1989). "Improved predictions of secondary structures for RNA." Proc. Natl. Acad. Sci. **86**: 7706-7710.

Jaffe, E. S. H., N.L., Stein H., Vardiman J.W. (2001). "World Health Organization of Tumors, pathology and genetics." ARC.

- Jeffrey Barrick, T. T., Andrey Balakin, Richard Roberts (2001). "selection of RNA-Binding peptides Using mRNA-peptide fusions." Methods **23**: 287-293.
- Jennifer a. Doudna , T. R. C. (2002). "The chemical repertoire of natural ribozymes." Nature **418**: 222-228.
- Jensen, A. (1998). "HIV-1 Rev Nuclear Export Signal Binding Peptides Isolated by Phage Display." JMB **283**: 245-254.
- Ji, e. a. (2003). "MALAT-1, a novel noncoding RNA and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early stage non small cell lung cancer." Oncogene **22**: 6087.
- Jonas, G. (2001). "Binding of Phage-Displayed HIV-1 Tat to TAR RNA in the Prescence of Cyclin T1." Journal of Biomedical Science **8**: 430-436.
- Jonathan Hall, D. H. a. R. H. (1996). "Towards artificial ribonucleases. the sequence-specific cleavage of RNA in duplex." Nucleic Acids Research **24**(18): 3522-3526.
- Jones, e. a. (1997). "Trans-splicing resctions by ribozymes." Methods Mol. Biol. **74**: 341.
- Jose Gallego, G. V. (2001). "targeting RNA with small-molecule drugs: therapeutic promise and chemical challenges." Acc.Chem.Res **34**: 836-843.
- Joshua Mendell, H. D. (2001). "when the Message Goes Awry: Disease-Producing Mutations that Influence mRNA Content and performance." Cell **107**: 411-414.
- Joyce, G. F. (2002). "The antiquity of RNA-based evolution." Nature **418**: 214-221.
- Julia Bosher, M. L. (2000). "RNA interference: genetic wand and genetic watchdog." Nature **2**: E31-E36.
- Karande , e. a. (2004). "Discovery of transdermal penetration enhancers by high throughput screening." Nature **22**: 192.
- Katakura, Y. (1998). "The Importance of Ionic Strength as a Parameter in Screening Peptide Ligands from a Phage Display Library." Journal of Fermentation and Biotechnology **85**(4): 447-450.
- Kay, B. K. (1996). Phage Display of peptides and proteins : a laboratory manual, Academic Press INC.
- Kay, B. K. (2001). "Screening Phage-Displayed Combinatorial Peptide Libraries." Methods **24**: 240-246.
- Keefe, A. D. (2001). "One-Step Purification of Recombinant Proteins Using a Nanomolar-Affinity Streptavidin-Binding Peptide, the SBP-Tag." Protein Expression and Purification **23**: 440-446.

- Keegan, e. a. (2001). "The many roles of an RNA editor." Nature **2**: 869.
- Kent, O. (2000). "Kinetic Analysis of the M1 RNA Folding Pathway." Journal of Molecular Biology(304): 699-705.
- Ketting, e. a. (1999). "Mut-7 of c. elegans required for transposon silencing and rna interference, is a homolog of werner syndrome helicase and rnasd." Cell **99**: 133.
- Ketting, e. a. (2001). "Diver function in RNA interference and in synthesis of small rnas involved in developmental timing in c. elegans." Genes.Dev. **15**: 2654.
- Kharbanda S, e. I. (1995). "Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents." Nature **375**: 785.
- Khvorova, e. a. (2003). "functional siRNA and miRNA exhibits strand bias." Cell **115**: 209.
- Kirk, e. a. (2000). J.Am.Chem.Soc **122**: 980.
- Kirkness, e. a. (2003). "The dog genome: survey sequencing and comparative analysis." Science **301**: 1898.
- Klingler, J. and T. Friedrich (1997). "Site-specific interaction of thrombin and inhibitors observed by fluorescence correlation spectroscopy." Biophys J **73**(4): 2195-200.
- Konopka J.B., e. a. (1984). "An alteration of the human c-ABL protein K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity." Cell **37**: 1035-1042.
- Kretschmer-Kazemi, e. a. (2003). "The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility." NARS **31**: 4417.
- Krishnamurthy, e. a. (2004). "Peptide Quinoline Conjugates: A New Class of RNA-Binding Molecules." Organic Letters **6**: 63
- Kronenwett, e. a. (1996). "Kinetic selectivity of complementary Nucleic Acids: bcr-abl directed Antisense RNA and Ribozymes." J.Mol:Biol **259**: 632.
- Krystal, e. a. (2001). "Mechanisms of resistance to imatinib (STI571) and prospects for combination with conventional chemotherapeutic agents." Drug Resist **4**: 16.
- Kurreck, e. a. (2003). "Antisense technologies. improvements through chemical modifications." Eur.J.Biochem. **270**: 1628.
- Kuwabara, e. a. (2004). "A small ,modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells." Cell **116**: 779.
- Lagerkvist, A. C., Z. Foldes-Papp, et al. (2001). "Fluorescence correlation spectroscopy as a method for assessment of interactions between phage displaying antibodies and soluble antigen." Protein Sci **10**(8): 1522-8.

Lagos-quintana, e. a. (2003). "New microRNAs from mouse and human RNA." RNA **9**: 175.

Lai, e. a. (2003). "microRNAs: runts of the genome assert themselves." Curr.Biol. **13**: R925.

lan, e. a. (1998). "ribozyme-mediated repair of sickle beta-globin mRNAs in erythrocyte precursors." Science **280**: 1593.

lan, e. a. (2000). "Enhancing RNA repair efficiency by combining trans-splicing ribozymes that recognize different accesible sites on a target rna." Mol.Ther. **2**: 245.

Larsson, S. L. (2001). "Proposed Secondary Structure of Eukaryote Specific Expansion Segment 15 in 28S rRNA from Mice, Rats, and Rabbits." Biochemistry(40): 3222-3231.

le Coutre, e. a. (2000). "Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines." Blood **95**: 3498.

Lebedeva, e. a. (2001). "Antisense oligonucleotides: promise and reality." Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. **41**(403).

Lee, e. a. (2002). "Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells." Nature **20**: 500.

Lee, e. a. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular lualization." EMBO **21**: 4663.

Lee, e. a. (2003). "The nuclear RNaseIII drosha initiates micro rna processing." Nature **425**: 415.

Leontis, N. B. (2001). "Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs." RNA(7): 499-512.

Levan, A. (1967). "Some current problems of cancer cytogenetics." Hereditas **57**: 343-355.

Levitan, B. (1998). "Stochastic Modeling and Optimization of Phage Display." JMB **277**: 893-916.

Li, M. (2000). "Applications of display technology in protein analysis." Nature **18**: 1251-1256.

Lindsay (2003). "Target discovery." Nature **2**: 831.

Lu, e. a. (2003). "functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." Nature **9**: 1009.

Lynda Ratmeyer, M. Z., Michael Green, Ravi Vinayak, Arvind Kumar, David Boykin, david Wilson (1996). "Inhibition of HIV-1 rev-rre interaction by diphenylfuran derivatives." Biochemistry **35**: 13689-13696.

M Scherr, A. M., S Klein, A Ganser, JW Engels, M Grez (1998). "effective reversal of a transformed phenotype by retrovirus-mediated transfer of a ribozyme directed against mutant n-ras." Gene Therapy **5**: 1227-1234.

Mahon, e. a. (2000). "Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance." Blood **96**: 1070.

Makeyev, e. a. (2002). "Targeting a KH-domain protein with RNA decoys" RNA **8**:1160

Mandal, e. a. (2004). "Gene regulation by riboswitches." Nature **5**: 451.

Maquat, L. (2002). "RNA-Protein interactions: insight into gene function." Methods **26**: 93-94.

Marr, J. (1996). "Ribozymes as theraoeotic agents." DDT **1**(3): 94-102.

Mathews (1999). "Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure." Journal of Molecular Biology **288**(5): 911-40.

Matsuda, e. a. (2003). "Electroporation and RNAi in the rodent retina in vivo and in vitro." Proc.Natl.Acad.Sci **101**(16).

Mattick J., e. a. (1994). "Introns: evolution and function." Curr.Opin.Genet.Dev. **4**: 823.

Mattick J., e. a. (2001). "The evolution of controlled multitasked gene networks; the role of introns and other noncoding rnas in the development of complex organisms." Mol.Biol.Evol **18**: 1611.

Mattick J., e. a. (2003). "Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding rnas in complex organisms." Bioessays **25**: 930.

Mattick J., e. a. (2004). "RNA regulation: a new genetics?" nature **5**: 316.

Matzke, e. a. (2003). "RNAi extends its reach." Science **301**: 1060.

McCaffrey, e. a. (2002). "RNAi in adult mice." Nature **418**: 38.

McConnell, S. J. (1998). "Biopanning Phage display Libraries Using Magnetic Beads Vs. Polystyrene Plates." Biotechniques **26**: 208-214.

McWhirter JR, e. a. (1993). "A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. transduction." Mol.Cell.Biol. **13**: 7578.

Mendoza-Maldonado, e. a. (2002). "Purging of chronic myelogenous leukemia cells by retrovirally expressed anti-bcr-abl ribozymes with specific cellular compartmentization." Cancer gene Therapy **9**: 71.

Mette, e. a. (2000). "Transcriptional silencing and promotor methylation triggered by double stranded rna." EMBO **19**: 5194.

Michaela Scherr, K. B., Thomas Winkler, Olaf Heidenreich, Arnold Ganser, Matthias Eder (2003). "specific inhibition of bcr-abl gene expression ba small interfering RNA." Blood **101**(4): 1566-1569.

Michienzi, e. a. (2000). "Ribozyme-mediated inhibition of HIV1 suggests nucleolar trafficking of the HIV1 RNS." PNAS **97**: 8955.

Micura, e. a. (2003). "On secondary structure rearrangements and equilibria of sml rnas." CBC **4**: 984.

Milenic, e. a. (2004). "antibody-targeted radiation cancer therapy." nature **3**: 488.

Miller, e. a. (2003). "Allele-specific silencing of dominant disease genes." Proc.Natl.Acad.Sci **100**: 7195.

Miyagishi, e. a. (2003). "Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNA directed against the same targets bin mammalian." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **13**: 1.

Mlynarczyk, e. a. (2000). "X inactivation: Tsix and Xist as yin and yang." Curr.Biol. **10**: R899.

Moazed, e. a. (1987). Nature **327**: 389.

Monika Wilds, U. F., Wilhelm Wössmann, Arndt Borkhardt (2002). "Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference." Oncogene **21**: 5716-5724.

Mucha, P. (2002). "Interaction of RNA with phage display selected peptides analysed by capillary electrophoresis mobility shift assay." RNA **8**: 698-704.

Muller AJ, e. a. (1991). "BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene in Philadelphia chromosome positive leukaemias." Mol.Cell.Biol. **11**: 1785.

Nimmanapalli, e. a. (2002). "Novel targeted therapies for BCR-ABL positive acute leukamies beyond sti579." Oncogene **21**: 8584.

Noren, K. A. (2001). "construction of High-complexity Combinatorial Phage Display Peptide Libraries." Methods **23**: 169-178.

Nowell P, H. D. (1960). "A minute chromosome in human granlulocytic leukemia." Science **132**: 1497.

O'Brian, e. a. (1994). "Antisense bcr-abl oligomers cause non-specific inhibition of chronic myeloid leukemia cell lines." Leukemie **8**: 2156.

Okazaki, e. a. (2002). "Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60770 full length cDNAs." Nature **420**: 563.

Okumoto, Y. (2002). "Immobilised Small desoxyribozyme to Distinguish RNA Secondary Structures." Biochemistry(41): 2769-2771.

Olivier Donzé, D. P. (2002). "RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase." Nucleic Acids Research **30**(10).

Palo, K., U. Mets, et al. (2000). "Fluorescence intensity multiple distributions analysis: concurrent determination of diffusion times and molecular brightness." Biophys J **79**(6): 2858-66.

Pan, W.-H. (2001). "A selection system for identifying accessible sites in target RNAs." RNA(7): 610-621.

Pasquinelli, e. a. (2002). "Control of developmental timing by microRNAs and their targets." Annu.Rev.Cell Dev.Biol. **18**: 495.

Pendergast AM, e. a. (1991). "BCR sequences essential for transformation by the BCRABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner." Cell **66**: 161.

Perrotti, e. a. (2002). "BCR-ABL suppresses C/EBP α expression through inhibitory action of hnRNP E2" Nature Genetics **30**: 48

Persengiev, e. a. (2004). "Nonspecific, concentration dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs." RNA **10**: 12.

Pustowka, e. a. (2003). "Identification of peptide ligands for target RNA structures derived from the HIV-1 packaging signal ψ by screening phage-displayed peptide libraries." CBC **4**: 1093.

Rabbitts T.H., e. a. (1988). "Chromosomal abnormalities in lymphoid tumors." Trends Genet. **4**: 300.

Ralf Kronwett, r. H., Georg Sczakiel (1996). "Kinetic selectivity of Complementary Nucleic Acids: bcr-abl-directed Antisense RNA and Ribozymes." JMB **259**: 632-644.

Ramira Mendoza-Maldonado, L. Z., Renato Fanin, Mauro Giacca (2002). "Purging of chronic myelogenous leukemia cells by retrovirally expressed anti-bcr-abl ribozymes with specific cellular compartmentalization." Cancer gene Therapy **9**: 71-86.

Redemann, N., et al (1992). "Anti-oncogenic activity of signaling-defective epidermal growth factor receptor mutants." Mol.Cell.Biol. **12**: 491.

- Resh MD, e. a. (1990). "Membrane interactions of pp60v-src: A model for myristylated tyrosine protein kinases." Oncogene **5**: 1437.
- Richard roberts, J. S. (1997). "RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins." PNAS **94**: 12297-12302.
- Ridanpaa, e. a. (2001). "Mutations in the rna component of rnase mrp cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia." Cell **104**: 195.
- Roberts, R. W. (1997). "RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides." PNAS **94**: 12297-12302.
- Ron D, e. a. (1991). "A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr." New Biol **3**: 372.
- Rondon I.J., e. a. (1997) "Intracellular antibodies (intrabodies) for gene therapy of infectious diseases" Annu. Rev. Microbiol. **51**:257
- Rowley, J. D. (1973). "A new consistent chromosomal abnormality in cgronic myelogenous leukemai identified by quiacrine fluorescence and giemsa staining." Nature **243**: 290-293.
- Rowley, J. D. (2001). "chromosome translocations: dangerous liaisons revisited." Nature **1**: 245.
- Ryan Austin, T. X., Jinsong Ren, Terry Takahashi, Richard Roberts (2002). "designed Arginine-Rich RNA-Binding peptides with Picomolar Affinity." JACS **124**: 10966-10967.
- Saglio G, e. (1990). "New type of BCR/ABL junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia." Blood **76**: 1819.
- Sarah Kirk, N. L., Yitzhak Tor "Neomycin-Acridine Conjugate:A potent inhibitor of rev-rre binding."
- Sawyers CL, e. a. (1992). "The bcr-abl gene in Chronic Myelogenous Leukaemia." Cancer surv **12**: 37.
- Sayda elbashir, J. H., Winfried Lendeckel, Abdullah Yalcin, Klaus Weber, Thomas Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**: 494-498.
- Schechter, A. L., et al (1984). "The neu oncogene: an erbB related gene encoding a 185000 Mr tumor antigen." Nature **312**: 513.
- Scherer, e. a. (2003). "Approaches for the sequence specific knockdown of mRNA." Nature **21**: 1457.

- Scherer S.W., e. a. (2003). "Human chromosome 7: DNA sequence and biology." Science **300**: 767.
- Scherr, e. a. (2003). "Specific inhibition of bcr-avl gene expression by small interfering RNA." Blood **101**: 1566.
- Schichmann S., e. a. (1995). "Self-fusion of the ALL-1 gene." J.Am.Med.Assoc **273**: 571.
- Schroeder (1999-2000). "The energetics of small internal loops in RNA." Biopolymers **52**(4): 157-67.
- Schroeder, R. (2002). "RNA folding in vivo." Current Opinion in Structural Biology(12): 296-300.
- Schwartzberg, e. a. (1991). "Mice homozygous for the ablml mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations." Cell **65**: 1165.
- Schwarz, e. a. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**: 199.
- Scott Baskerville, D. P. B. (2002). "a ribozyme that ligates RNA to protein." PNAS **99**(14): 9154-9159.
- Scott hammond, A. C., Gregory hannon (2001). "Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA." Nature **2**: 110-119.
- Sengupta, P., J. Balaji, et al. (2002). "Measuring diffusion in cell membranes by fluorescence correlation spectroscopy." Methods **27**(4): 374-87.
- Sharp, P. (2001). "RNA interference - 2001." Genes & Development **15**: 485-490.
- Silver, A. S. B. a. P. A. (2002). "Identifying proteins that affect mRNA localization in living cells." Methods **26**: 151-155.
- Skorski, e. a. (1994). "Suppression of Philadelphia leukemia cell growth in mice by bcr-abl antisense oligodeoxynucleotides." PNAS **91**: 4504.
- Skorski, e. a. (1996). "Antisense oligodeoxynucleotide combination therapy of primary chronic myelogenous leukemia blast crisis in scid mice." Blood **88**: 1005.
- Slamon, D. J. e. a. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." Science **235**: 177.
- Sledz, e. a. (2003). "Activation on the interferon system by short interfering RNAs." Nature **5**: 834.
- Sorensen, e. a. (2003). "gene silencing by systemic delivery of synthetic sirnas in adult mics." J.Mol:Bio **327**: 761.

Stanulla, M., et al (1997). "DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation." Mol.Cell.Biol. **17**: 4070.

Sucheck, e. a. (2000). "Design of small molecules that recognize RNA: development of aminoglycosides as potential tumor agents that target oncogenic RNA." Angew.Chem.Int.Ed **39**: 1080.

Sucheck, e. a. (2000). "RNA as target for small molecules." Current Opinion in Chemical Biology **4**: 678.

Sucheck, S. J. (2000). "Design of Small Molecules That Recognize RNA." Angew. Chem **112**(6): 1122-1126.

Sullenger, e. a. (1994). "Ribozyme-mediated repair of defective mRNA by targeted trans-splicing." Nature **371**: 619.

Sutherland, e. a. (1996). "Identification of a novel transcript disrupted by a balanced translocation associated with digeorge syndrom." Am.J.Hum.Genet **59**: 23.

Sylvie Villard, e. a. (2003). "peptide decoys selected by phage display block in vitro and in vivo activity of a human anti-FVIII inhibitor." Blood **102**(3): 949-952.

Szczylik, e. a. (1991). "Selective inhibition of leukemia cell proliferation by bcr-abl antisense oligodeoxynucleotides." Science **253**: 562.

Tabara, e. a. (1999). "The rde-1 gene, RNA interference and transposon silencing in *C. elegans*." Cell **99**: 123.

Tamilarasu, N. (2001). "A New Strategy for Site-Specific Protein Modification: Analysis of a Tat Peptide - TAR RNA Interaction." Bioconjugate Chemistry **12**(2): 135-138.

Tauchi T, e. a. (1997). "A coiled-coil tetramerization domain of BCR-ABL is essential for the interactions of SH2-containing signal transduction molecules." J.Biol-Chem **272**: 1389.

Thompson, N. L. (2002). "Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy." Current Opinion in Structural Biology(12): 634-641.

Tom Maniatis, B. T. (2002). "Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans." Nature **418**: 236-243.

Tor, e. a. (1999). Angew.Chem.Int.Ed **111**: 1168.

Tor, e. a. (2003). "Targeting RNA with small molecules." CBC **4**: 998.

Treiber, D. K. (2001). "Beyond kinetic traps in RNA folding." Current Opinion in Structural Biology(11): 309-412.

Turner (1988). "RNA structure prediction." Annu Rev Biophys Chem(17): 167-92.

Tybulewicz, e. a. (1991). "Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene." Cell **65**: 1153.

Uli, e. a. (2003). NARS Therapeutic modulation of endogenous gene function by agents with designed dna-sequence specificities(31).

Ullrich, A., et al (1984). "Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cell." Nature **309**: 418.

Van-Etten-RA, e. a. (1989). "The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization." Cell **58**: 669.

Varani, e. a. (2001). "RNA structure." Nature.

Venter J.C., e. a. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**: 1304.

Vicens, e. a. (2003). "RNA as Drug Target: The Case of Aminoglycosides." ChemBioChem **4**: 1018.

Volpe, e. a. (2002). "Regulation of heterochromatic silencing and histone h3 lysin methylation by rnai." Science **297**: 1833.

Voncken LW, e. a. (1995). "Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants." Cell **80**: 719.

Vulliamy, e. a. (2001). "The rna component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita." Nature **413**: 432.

Walter, e. a. (2002). "Catalytic RNA." Nature.

Wang, e. a. (1998). Angew.Chem.Int.Ed **110**: 117.

Wang, e. a. (2001). "Replicating satellite RNA induces sequence specific DNA methylation and truncated transcripts in plants." RNA **7**: 16.

Wang, J. (2000). "In vitro selection of novel RNA ligands that bind human cytomegalovirus and block viral infection." RNA **6**: 571-583.

Wassenegger, e. a. (1998). "A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants." Plant.Mol.Biol. **37**(349).

Watters, J. M. (1997). "an optimized method for cell-based phage display panning." Immunotechnology **3**: 21-29.

- Wen ST, e. a. (1996). "The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localisation signals and requires the p53 and Rb tumour suppressor gene products." EMBO **15**: 583.
- Wilda, e. a. (2002). "Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference." Oncogene **21**: 5716.
- Wilson, D. R. (1998). "Phage display: applications, innovations, and issues on phage and host biology." Can. J. Microbiol. **44**: 313-329.
- Wilson, D. S. (2001). "The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides." PNAS **98**(7): 3750-3755.
- Witte O.N., e. a. (1980). "Abelson murine leukemia virus protein is phosphorylated in vitro to form phosphotyrosine." Nature **281**: 396-398.
- Wolf, e. a. (2001). "B-cell neoplasia associated gene with multiple splicing: the candidate B-CLL gene on 13q14 comprises more than 560kb covering all <critical regions." Hum.Mol.Genet **10**: 1275.
- Wong, S. J. S. a. C.-H. (2000). "RNA as a target for small molecules." Current Opinion in Chemical Biology **4**: 678-686.
- Woodson, S. A. (2000). "recent insights on RNA folding mechanisms from catalytic RNA." Cellular and Molecular Life Sciences(57): 796-808.
- Wu, C. W., P. S. Eder, et al. (2001). "Kinetics of coupling reactions that generate monothiosphosphate disulfides: implications for modification of RNAs." Bioconjug Chem **12**(6): 842-4.
- Xu, e. a. (2003). "Effective small interfering RNAs and phosphorothioate antisense DNAs have different preferences for target sites in the luciferase mRNA." Biocgem.Biophys.Res.Comm. **306**: 712.
- Yamamoto, T., et al (1983). "A new avian erythroblastosis virus, AEV-H, carries erbB gene responsible for the induction of both erythroblastosis and sarcoma." Cell **34**: 225.
- Yarus, M. (2000). "RNA-ligand chemistry: A testable source for the genetic code." RNA **6**: 475-484.
- Yokota, e. a. (2004). "siRNA based inhibition specific for mutant SOD1 with single nucleotide alteration in familial ALS. compared with ribozymes and DNA enzyme." Biocgem.Biophys.Res.Comm. **314**: 283.
- Yuan, Y. (2003). "Stem of SL1 RNA in HIV-1." Biochemistry(42): 5259-5269.
- Zeng, e. a. (2002). "RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm." RNA **8**: 855.

Zuker (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridisation prediction." Nucleic Acids Research **31**(13): 3406-15.

Zuker, A. M. "Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction."

Zuker, A. M. (1994). "Prediction of RNA secondary structure by energy minimization." Methods in Molecular Biology(25): 267-94.

Abkürzungsverzeichnis

μ-bcr	Micro Breakpoint-Cluster-Region
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
BCR	Breakpoint cluster Region
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cirkular Dichroitisch
CIP	Calf intestinal phosphatase
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CNL	Chronische Neutrophile Leukämie
CoA	Coenzym A
CR	Komplette Remission
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DLA	Dual Luzferase Assay
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleotidtriphosphate
Ds	Doppelsträngig
DuL	Deletion unterer Loop;RNA Mutante

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epithelial Growth FactorReceptor
EST	expressed sequence tag
FAB	French-American-British
FCS	Fluoreszenze correlations Spektroskopie
FSH	Follikel-Stimulierende-Hormon
G	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GIST	gastrointestinalen stroma Tumoren
GMPS	Guanosin Mono Phosphoro Thioat
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GvHD	Graft versus Host Disease
HLA	humane Leukozytenantigene
HPLC	High preasure liquid chromatographie
i.v.	intravasal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl β D-Thiogalactopyranosid
kB	Kilobasen
KD	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
M	Molar
mAB	Antikörper, Maus
m-bcr	Minor Breakpoint Cluster Region

M-bcr	Major Breakpoint Cluster Region
MD	Mega Dalton
Mdeg	CD Einheit
Min	Minuten
miRNA	micro RNA
MI	Milliliter
mM	Millimolar
Mod	Modifikation
MOI	multiplicity of infection
MoL	Mutation oberer Loop, RNA Mutante
MoS	Mutation oberer Stam, RNA Mutante
MS	Massenspektroskopie
Mw	Molekulargewicht
ncRNA	Nicht kodierende RNA
Ng	Nanogramm
Nt	Nukleotid
OH ⁻	Alkalische Hydrolyse
ORF	open reading frame
PAA	Polyacryamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phenol-Chloroform
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PduS	Partielle deletion unterer Stam, RNA Mutante
PEG	Poly Ethylen Glycol
Ph+	Philadelphia positiv

PhD	Phage Display
PTH	Parathormon
RC RNA	Name für die RNA Zielstrukturen
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RISC	RNA inducing silencing complex
RNAi	RNA interference
RRE	Rev response element
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor tyrosin kinasen
RT	reverse transcriptase
SDS	Sodium-Dodecyl-Sylfat
siRNA	short interference RNA
snoRN	small nucleolar RNA
Ss	einzelsträngig
stRNA	short temporal RNA
T3	Triplettzustand
TE	Tris-EDTA
Temed	Tetramethylethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur
tRNA	Transfer RNA
U	Units
Ü/N	Über Nacht
UTR	un translated region
UV	Ultraviolett

V	Volt
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

Veröffentlichungen und Kongreßbeiträge

Bäumler J., Grez M., „RNA-ligands as therapeutic molecules“, GSH, Frankfurt 2003

Bäumler J., Grez M., „RNA-ligands as therapeutic molecules - peptide ligands for the bcr-abl mRNA“, SFB579 Retreat, Weilburg 2003

Bäumler J., Grez M., „RNA-ligands as therapeutic molecules“, SFB579 Symposium, Frankfurt 2003

Bäumler J., Göbel M., Grez M., „The BCR-ABL translocation breakpoint as target for RNA-ligands“, GSH Frankfurt 2004

Bäumler J., Gwanmesia P., Scheffer U., Göbel M., Schwalbe H., Grez M. Vorläufiger Titel „Selection and characterisation of peptides binding the translocation breakpoint of the b2a2 mRNA“, RNA (Manuskript in Vorbereitung)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main in Kooperation mit dem SFB 579 „RNA-Liganden Interaktion“ der Johann Wolfgang-Goethe Universität in der Arbeitsgruppe Dr. Grez durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Engels danke ich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich „Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften“ der Johann Wolfgang Goethe-Universität.

Herrn Prof. Dr. Wels danke ich sehr für die Bereitschaft, das Zweitgutachten dieser Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Manuel Grez für die Möglichkeit, an diesem Thema zu arbeiten, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der Übernahme der Betreuung am Georg-Speyer-Haus. Seine fruchtbaren Ratschläge trugen entscheidend für das Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Dr. Stefan Stein danke ich für die fachlichen Diskussionen, für die praktischen Ratschläge sowie für die Durchsicht und Korrekturvorschläge dieser Arbeit.

Frau Dr. Ute Scheffer danke ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit im SFB 579, für die konstruktiven Korrekturvorschläge und für die zahlreichen fachlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Schwalbe danke ich für die gute Zusammenarbeit im SFB579 und für die Möglichkeit, am CD-Spektrometer zu arbeiten.

Herrn Dr. Hans-Diether Barth danke ich für die gute Kooperation im SFB579, sowie für die Bereitschaft, das FCS zu betreuen.

Herrn Christian Wichmann danke ich für die zahlreichen fachlichen Diskussionen sowie für die Durchsicht dieser Arbeit.

Frau Patricia Gwanmesia danke ich für die konstruktive Mitarbeit an diesem Projekt.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Grez sowie den Mitgliedern anderer Arbeitsgruppen am Georg-Speyer-Haus für die gute Zusammenarbeit, ihrer Hilfsbereitschaft und für die gute Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Miao, die mich während den Höhen und Tiefen dieser Arbeit ertragen mußte, für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht und für die Motivation.

Meinen Eltern danke ich besonders dafür, daß ich diesen Weg gehen konnte, für ihre Unterstützung und für die Zuversicht.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt am Main, den 14.12.2004

Jörg Bäuml

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Bäumler
Vorname	Jörg
Geburtstag	16. März 1976
Geburtsort	Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

1982 bis 1985	Grundschule: Harmutschule in Eschborn
1985 bis 1986	Grundschule: Kirchnerschule in Frankfurt am Main
1986 bis 1989	Heinrich-von-Gagern-Gymnasium in Frankfurt am Main
1989 bis 1995	Lessing-Gymnasium in Frankfurt am Main
Juni 1995	Abitur am Lessing-Gymnasium in Frankfurt am Main

Hochschulstudium

Oktober 1996 bis Mai 2001	Studiengang der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
2000/2001	Diplomarbeit im Fachbereich Biophysikalische Chemie bei Prof. Rüterjans
Juni 2001 bis Dezember 2004	Promotion in Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main an dem assoziierten Georg-Speyer-Haus in der Arbeitsgruppe Dr. Grez in Kooperation mit dem Forscherverbund SFB 579

Sonstiges

Juli 1995 bis Juli 1996	Zivildienst als Rettungshelfer beim Arbeiter-Samariter-Bund in Eschborn; Ausbildung zum Rettungshelfer
Oktober 1997	Praktikum am MPI für Biophysik bei Herrn Dr. Fendler
März bis April 1999	Praktikum im Paul-Ehrlich-Institut bei Herrn Dr. Janssen
Juli bis August 1999	Praktikum im Georg-Speyer-Haus bei Prof. Groner